

Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen

Radiogene Aktivierung von K_v -Kaliumkanälen in der
Zellmembran und die Auswirkungen auf den
postradiogenen G_2/M -Arrest in HEK 293-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Braun, Lore Helene
geb. Reuter

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. M. Huber

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Just

Tag der Disputation: 11.05.2017

Meiner Oma Manne

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Zellzyklus	12
1.2 Auswirkung von Bestrahlung auf den Zellzyklus	14
1.3 Rezeptortyrosinkinasen.....	17
1.4 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg.....	19
1.5 Kaliumkanäle in der Zellmembran.....	21
1.6 Rolle von Kalziumkanälen im Zellzyklus.....	27
1.7 Calcium/Calmodulin stimulated protein Kinasen (CaMK)	30
1.8 Zusammenhang von K _v -Kanälen und dem Kalziumhaushalt.....	31
1.9 Hypothese	31
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Zellkultur.....	33
2.2 Durchflusszytometrie.....	34
2.3 Western Blot.....	35
2.4 Patch Clamp-Messungen	37
2.5 Calciumimaging.....	40
2.6 Statistik.....	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Zellzykluskontrolle durch K ⁺ -Kanäle	43
3.2 Upstream-Signaling.....	45

3.3	Funktionelle Charakterisierung der strahlungsinduzierten Kaliumkanäle	48
3.4	Downstream-Signaling der radiogenen K_v K^+ -Kanäle.....	53
4	Diskussion.....	57
5	Zusammenfassung.....	66
6	Veröffentlichungen	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	79
9	Danksagung	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. The Hallmarks of Cancer	11
Abbildung 2. Ionisierende Strahlung induziert einen G2/M Zellzyklusarrest 24 h nach Bestrahlung in HEK 293-Zellen	44
Abbildung 3. Der K ⁺ -Kanal-Inhibitor TEA verzögert den Wiedereintritt in den Zellzyklus von bestrahlten HEK 293-Zellen 48 h nach Bestrahlung.	45
Abbildung 4. Radiogene Aktivierung des IGF- Rezeptors und der SGK1 - Kinase	46
Abbildung 5. Exemplarische Stromableitungen von bestrahlten HEK 293 - Zellen.	48
Abbildung 6. Radiogene Aktivierung von K _v -Kanälen.....	49
Abbildung 7. Zeitlicher Verlauf der Stromspannungskurven nach Bestrahlung mit 1 Gy	50
Abbildung 8. Dosisabhängigkeit der radiogenen K _v -Kanalaktivierung in HEK 293-Zellen	51
Abbildung 9. TEA inhibiert die radiogen aktivierten K _v K ⁺ -Kanäle in HEK 293-Zellen.	51
Abbildung 10. Dosisabhängige Inhibition der K ⁺ -Leitfähigkeit von HEK 293-Zellen durch TEA.....	52
Abbildung 11. Die für K _v 1.1-1.3 spezifischen Inhibitoren Margatoxin und Agitoxin haben kaum einen Effekt auf die radiogen aktivierten K _v -Kanäle in HEK 293-Zellen.	52
Abbildung 12. Zeitabhängige Veränderung der freien zytosolischen Kalziumkonzentration durch extrazelluläre Kalziumdepletion und nach Kalziumzugabe in HEK 293-Zellen.....	54
Abbildung 13. Auswirkung von TEA auf den Kalziumeinstrom in HEK 293-Zellen nach Kalzium-Depletion	55
Abbildung 14. Induktion des radiogenen Kalziumeinstroms im Zeitverlauf in HEK 293-Zellen	56

Abkürzungsverzeichnis

ATR	ATR serine/threonine kinase, Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein
A549-Zellen	Humane Bronchialadenokarzinomzellreihe
ATM	ATM serine/threonine kinase, Ataxia Telangiectasia Mutated
CaM	Ca ²⁺ /Calmodulin
CCE	Capacitative Ca ²⁺ Entry
CdK	CyclindependentKinase
DDR	DNA DamageResponse
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DSB	Double Strand Break, Doppelstrangbruch
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	EndoplasmatischesRetikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hEAG	Human Ether à Gogo Potassium Channel, K _v 10.1
HEK 293	Human Embryonic Kidney Cells 293, humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HR	Homologe Rekombination
ICRAC	Ca ²⁺ Release Activated Current
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-R	Insulin-like Growth Factor Receptor
IK-Kanäle	Ca ²⁺ -activated IK K ⁺ Channels, KCa3.1
IRS	Insulin Rezeptor Substrat
K 562-Zellen	Humane Leukämiezellreihe (CML)

K _v -Kanal, K _v x.x	Voltage-Gated Potassium Channel, spannungsaktivierter Kaliumkanal
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
MCF-7	Humane Mammakarzinomlinie
MPF	Mitosis Promoting Factor
NHEJ	Nonhomologous End-Joining, Nicht-homologe Rekombination
NHERF2	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Regulatory Factor 2
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDK-1	Phosphoinositide dependent Kinase 1
PHA	Phytohämagglutinin
PH-Domäne	Pleckstrin Homology Domain
PI	Propidiumiodid
PI _(3,4) P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat
PI _(3,4,5) P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PI _(4,5) P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PI ₃ K	PI ₃ -Kinase
PK-B	Proteinkinase B, Akt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastom
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffradikale
RTK	Rezeptor tyrosinkinase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SGK-1	Serum and Glucocorticoid activated Kinase-1
SGLT	Sodium Glucose Cotransporter
Shc	Src Homology 2 Domain containing transforming Protein
SHIP	SH2-Containing Inositol Phosphatase
SOCE	Store Operated Calcium Entry

SSB	Single Strand Break, Einzelstrangbruch
SSC	SidewardScatter
STIM1	StromalInteraction Molecule 1
TBS	Tris-buffered Saline
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRPV-Kanäle	Transient Receptor Potential Channels

1 Einleitung

Die Bestrahlung ist neben der Chirurgie und der systemischen Therapie mit traditionellen Chemotherapeutika und den neueren Biologika eine grundlegende Säule der kurativen und palliativen Krebstherapie. Sie wird entweder alleine, adjuvant oder neoadjuvant zu operativen Verfahren, in Kombination mit oder sequentiell zu einer systemischen Therapie durchgeführt. Nach einer Analyse der australischen Arbeitsgruppe um Delaney aus dem Jahr 2005 sollte etwas mehr als die Hälfte aller Krebspatienten eine Bestrahlung in der einen oder anderen Form erhalten¹.

Die grundlegenden Wirkmechanismen der Bestrahlung sind auf zellulärer Ebene recht gut erforscht. Seit langem ist ein zentrales Ziel der klinischen Forschung sowie der Grundlagenforschung, über Fraktionierungsschemata, physikalische Einwirkungen wie beispielsweise der Hyperthermie oder pharmakologische Therapien wie der Kombination mit „Radiosensitizers“ wie z. B. Mitomycin C eine tumorspezifische Radiosensibilisierung zu erreichen, ohne gleichzeitig die Toxizität im Normalgewebe zu erhöhen. Hierfür muss neben den Effekten der Bestrahlung in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen genauer erforscht werden, welche spezifischen radioprotektiven Mechanismen in Tumorzellen existieren, um diese – sofern möglich – spezifisch zu beeinflussen. Tumorzellen unterscheiden sich in vielen wesentlichen Charakteristika von normalen Zellen. Die grundlegenden Merkmale, die eine Zelle im Rahmen der Tumorgenese erlangt und die sie von einer gesunden Zelle unterscheiden, sind in der wegweisenden Publikation von Weinberg und Hanahan „The Hallmarks of Cancer“ im Jahre 2000 herausgearbeitet und in „The Hallmarks of Cancer: The Next Generation“ im Jahre 2011 aktualisiert und erweitert worden^{2,3}.

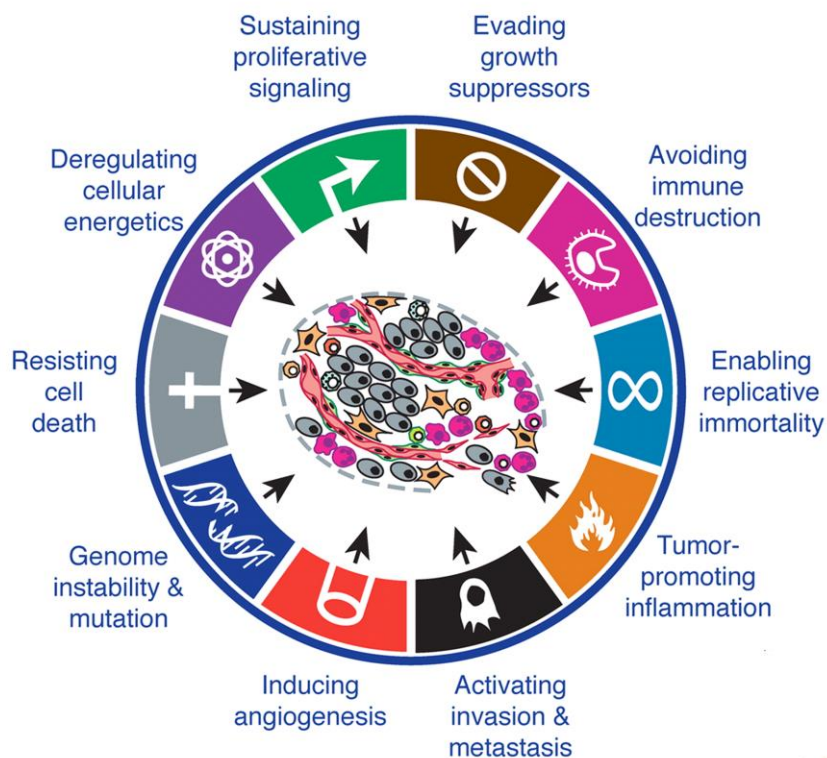


Abbildung 1 The Hallmarks of Cancer Typische Eigenschaften eines Tumors im Modell nach Hanahan/Weinberg; nach Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*144, 646–74 (2011), Copyright © 2011 Elsevier Inc

Um eine Therapie tumorspezifisch zu gestalten, muss sie auf die Unterschiede zwischen einer Tumorzelle und einer normalen Zelle abzielen. Ein möglicher vielversprechender Angriffspunkt sind in Tumoren qualitativ und/oder quantitativ verändert exprimierte Proteine. Hier bieten sich Ionenkanäle als potentielle Zielstruktur insofern an, als dass sie in mannigfaltigem Wege Einfluss auf die Tumorbilogie nehmen und als membranständige Moleküle von extrazellulär gut zugänglich sind. Einige sind zudem bereits gut erforscht und es werden im klinischen Alltag schon Kanalmodulatoren eingesetzt, allerdings bislang in der Onkologie nur im Rahmen von Studien⁴. Seit Mitte der neunziger Jahre ist bekannt, dass verschiedene Tumorentitäten veränderte Expressions- und Aktivitätsmuster von Ionenkanälen in der Zellmembran aufweisen⁵. Anfang der achtziger Jahre wurde entdeckt, dass insbesondere Kaliumkanäle auf die Proliferation und Aktivierung von Zellen einen entscheidenden Einfluss nehmen⁶. Eine Überexpression von bestimmten Kaliumkanälen in der

Zellmembran kann zur malignen Transformation der Zelle führen und zumindest ein spannungsaktivierter Kaliumkanal (hEAG oder auch $K_v10.1$) erfüllt die Kriterien eines klassischen Onkogens^{4,7,8}. Die Transfektion von Zellen mit $K_v10.1$ führt zu einer Transformation der Zellen: diese wachsen schneller, sie proliferieren auch bei niedrigem Angebot an Substraten und Wachstumsfaktoren und verlieren die physiologische Kontaktinhibierung. Werden diese Zellen in immundefiziente Mäuse injiziert, entwickeln sie sich rasch zu invasiv wachsenden Tumoren⁷. In In vivo-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die postradiogene Aktivierung von verschiedenen Kaliumkanälen sowohl Glioblastom- als auch Leukämiezellen einen Überlebensvorteil nach Bestrahlung bot^{9,10}.

1.1 Zellzyklus

Der Zellzyklus einer normalen proliferierenden Zelle teilt sich in zwei Phasen auf, die Interphase und die M-Phase, welche sich wiederum in mehrere Abschnitte aufgliedern. Die Interphase besteht aus drei verschiedenen Phasen, die sequentiell durchlaufen werden müssen.

G₁-Phase: Synthese der für die DNA-Replikation sowie der für die Mitose nötigen Proteine und Ribosomen

S-Phase: DNA-Replikation

G₂-Phase: Synthese von für die Mitose notwendigen Proteinen, Vorbereitung der Mitose

M-Phase: die eigentliche Mitose, welche sich wiederum in 5 Abschnitte aufteilt (Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase).

Danach folgt die Zytokinese, also die Abspaltung der Tochterzelle von der Mutterzelle¹¹. Nach der M-Phase kann die Zelle entweder erneut in den Zellzyklus eintreten und sich weiter teilen oder sie tritt in die sogenannte G₀-Phase ein, die einen Ruhezustand der Zelle innerhalb des Zellzyklus darstellt. Zellen in der G₀-Phase sind ausdifferenzierte Zellen, die wie Zellen in der G₁-Phase einen einfachen DNA-Strang besitzen. Zellen in der G₀-Phase können

beispielsweise durch eine Stimulierung mit externen Wachstumsfaktoren oder im Fall von Immunzellen durch Kontakt mit einem speziellen Antigen wieder in die G₁-Phase und damit in den Zellzyklus eintreten¹².

Die Abläufe innerhalb des Zellzyklus werden nach dem Übertreten des sogenannten Restriction Point beim Übergang der G₁ in die S-Phase von extrazellulären Signalen weitestgehend unabhängig¹³, da die Zelle sich von diesem Punkt an auf das Programm „Zellteilung“ festlegt¹². Deshalb muss dieser Übergang strengstens reguliert und kontrolliert werden. Einen zentralen Kontrollmechanismus stellt das Passieren von sogenannten Cell Cycle Checkpoints dar¹¹. Ein Beispiel hierfür stellen DNA Structure Checkpoints dar, welche dazu in der Lage sind, die Zellzyklusprogression zu verlangsamen oder anzuhalten, wenn DNA-Schäden oder anderweitige Probleme während der DNA-Replikation registriert werden. Eine Vielzahl der involvierten regulatorischen Proteine ist in entarteten Zellen herunterreguliert, deletiert oder mutiert, was die grundlegende Bedeutung der Checkpoints im Hinblick auf die Karzinogenese unterstreicht¹¹.

Die zentralen Regulatoren der Zellzyklusinitiierung und -progression sind die Cyclin dependent Kinases (CdK) in Verbindung mit den für die einzelnen Phasen des Zellzyklus spezifischen Cyclinen. Sie stoßen die Transkription der für den Zellzyklus notwendigen Proteine und gleichzeitig eine Degradation oder Inhibierung von proliferationshemmenden Proteinen an. Jegliche Regulierung des Zellzyklus wird über CdK vermittelt^{14,15}. Es gibt mehrere verschiedene Klassen an CdK und zugehörigen Cyclinen, die für unterschiedliche Phasen des Zellzyklus von grundlegender Bedeutung sind. Die Regulation des für die Festlegung zur Zellteilung entscheidenden Überganges von der G₁- zur S-Phase wird von dem Komplex aus CdK-4 oder CdK-6 und Cyclin D festgelegt. Die frühe S-Phase wird von CdK-2/Cyclin E, die späte S-Phase und G₂-Phase von CdK-2/Cyclin A reguliert, während für die Einleitung der M-Phase und dem koordinierten Ablauf der Mitose CdK-1/Cyclin B (auch als Mitosis Promoting Factor (MPF) bekannt) zuständig sind^{11,14,16}. In der G₁-Phase, am Restriction Point, entscheidet sich, ob die Zelle in Richtung S-Phase und damit weitestgehend unabhängig von externen Faktoren zur Mitose fortschreitet¹³.

Verschiedene andere Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei dem reibungslosen Progress durch den Zellzyklus. Zu erwähnen sind hier Oszillationen des intrazellulären Kalziumspiegels¹⁷, rhythmische Veränderungen des Membranpotentials im Sinne einer Hyperpolarisation beispielsweise beim Übergang G₁/S-Phase sowie einer Depolarisation beim Übergang G₂/M-Phase¹⁸ sowie die präzise Regulierung des Zellvolumens^{19–21}, der zytosolischen Osmolarität und des intrazellulären pH-Wertes²².

1.2 Auswirkung von Bestrahlung auf den Zellzyklus

1.2.1 Biophysikalische Effekte der Bestrahlung

Die Auswirkungen einer Bestrahlung auf der zellulären Ebene sind vielfältig und beruhen auf verschiedenen Mechanismen.

Die Bestrahlung von Zellen führt zu direkten und indirekten DNA-Schäden. Direkte DNA-Schäden sind deutlich seltener, sie treten dann auf, wenn ein DNA-Molekül direkt von ionisierender Strahlung getroffen wird²³. Hieraus resultieren meist Einzel- oder Doppelstrangbrüche oder kovalente Verknüpfungen zwischen den DNA-Strängen. Indirekte DNA-Schäden werden durch Moleküle in der Umgebung der DNA erzeugt, die von ionisierender Strahlung getroffen und radikalisiert werden. Hierbei können hoch reaktive Ionen und organische Radikale entstehen, die mit Sauerstoff zu Reactive Oxygen Species (ROS) reagieren können. ROS können chemische Reaktionen mit DNA-Molekülen eingehen und so zu DNA-Schäden führen^{23,24}.

Um langfristigen Schäden durch DNA-Veränderungen entgegenzuwirken, haben Zellen Mechanismen entwickelt, diese zu erkennen und zu reparieren. Die Prozesse werden in ihrer Gesamtheit DNA Damage Response (DDR) genannt²⁵. Eine Aktivierung der DDR führt entweder zu einer Verlangsamung des Zellzyklus, sodass entstandene Schäden vor dem Eintritt in die Mitose behoben werden können oder, falls dies mit den unten beschriebenen Mechanismen nicht möglich ist, zu einer Aktivierung von Signalwegen, die die Zelle in die Apoptose oder die terminale Seneszenz führen^{26,27}. Hierdurch soll

sichergestellt werden, dass entstandene Schäden nicht an die nächste Generation von Zellen vererbt werden können ²⁸.

Die Proteine, die in diese Vorgänge involviert sind, sind einerseits evolutionär stark konserviert, was ihre Relevanz für den fehlerlosen Ablauf der Zellteilung unterstreicht. Andererseits sind sie in zahllosen Tumoren entweder herunterreguliert oder mutiert, was wiederum auf ihre Bedeutung in der Tumorgenese schließen lässt ¹².

Demgegenüber konnte allerdings auch in mehreren Zelllinien gezeigt werden, dass ionisierende Strahlen eine Aktivierung von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen bewirken können ²⁹⁻³¹. Eine Aktivierung der RTK führt über verschiedene Mechanismen, unter anderem eine effektivere und schnellere DNA-Reparatur und einer gleichzeitig erhöhten Toleranzschwelle der Zellen gegenüber DNA-Schäden, zu einem erhöhten Überleben der Zellen nach Bestrahlung. Dies wurde sowohl für den EGF-Rezeptor ²⁴ als auch für den IGF-Rezeptor nachgewiesen ³⁰.

1.2.2 Reparaturmechanismen der Zelle

Verschiedene Formen der DNA-Schädigung sind unterschiedlich gravierend in ihren Auswirkungen auf die Zelle und stellen komplexe Anforderungen an die Reparaturmechanismen dar. Einfache Defekte wie die Oxidierung von Basen oder des Phosphodiesterstranges der DNA, Bildung von kovalenten Quervernetzungen innerhalb des DNA-Stranges oder auch mit externen Molekülen, Desaminierung von Cytosin oder die Aufspaltung von Purinringen können meist effektiv und fehlerlos durch Basen-Exzisions-Reparaturmechanismen behoben werden ³².

Der für die Zelle am schwierigsten zu reparierende DNA-Schaden ist der Doppelstrangbruch²⁴. Doppelstrangbrüche sind zwar seltener als Einzelstrangbrüche, aber für die Zelle in ihren Auswirkungen deutlich gefährlicher ¹³. Um Doppelstrangbrüche zu reparieren stehen der Zelle zwei unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung: die homologe und die nicht-

homologe Rekombination. Bei strahlungsinduzierten Doppelstrangbrüchen überwiegt die nicht-homologe Rekombination (NHEJ – Nonhomologous End-Joining)²⁴.

In der homologen Rekombination (HR) wird die homologe DNA-Sequenz des duplizierten DNA-Stranges des Schwesterchromatids als Vorlage für die Neusynthese der DNA verwendet, während die NHEJ freie DNA-Enden ohne das Vorliegen einer DNA-Vorlage verknüpft. Deshalb findet die HR hauptsächlich in denjenigen Phasen des Zellzyklus statt, in denen die DNA bereits repliziert wurde (also in der S- und G₂-Phase)¹³. Die NHEJ hingegen kann während dem gesamten Zellzyklus Anwendung finden, sie ist allerdings fehleranfälliger als die HR und führt deutlich häufiger zu Insertionen und Deletionen²⁴.

1.2.3 Kontrolle des Zellzyklus durch Cell Cycle Checkpoints

Für die beiden wichtigsten Schritte im Zellzyklus existieren zwei separate DNA Checkpoints, einen für den Übergang G₁/S-Phase und einen für den Übergang G₂/M-Phase²⁴. Es handelt sich hierbei um den DNA Damage Checkpoint und den DNA Replication Checkpoint, die beide das Fortschreiten des Zellzyklus und gegebenenfalls den Eintritt in die Mitose verzögern und eine spezifische Transkriptionsantwort auf die DNA-Schädigung bewirken können¹¹.

Sobald durch die Reparaturmechanismen der DNA-Schaden behoben wurde, wird der DNA Damage Response inaktiviert und der Zellzyklus kann normal fortgeführt werden³³. Wenn es der Zelle nicht gelingt, die bestehenden Schäden zu reparieren, können sie zur Deletion von Genen, zu Translokationen oder Desorganisation von Chromosomen führen. Diese Veränderungen des Erbgutes resultieren, falls die Mitose noch durchgeführt werden kann, im Normalfall bei den Tochterzellen in den programmierten Zelltod, in der mitotischen Katastrophe, in der endgültigen Seneszenz oder im schlimmsten Fall der genetischen Instabilität und der malignen Progression^{25,28}.

1.3 Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind transmembranäre Proteine, die durch die extrazelluläre Bindung von spezifischen Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Eine Aktivierung kann jedoch auch durch unspezifische Stressreize wie UV-Strahlung, Hypothermie, ionisierender Strahlung, Hypoxie und oxidativen Stress zustande kommen ^{29,34}. Nach der Aktivierung kommt es zu einer Autophosphorylierung an Tyrosinresten des intrazellulären Anteils der Rezeptoren, wodurch eine Bindung und Aktivierung von Adapterproteinen wie IRS-1 und von Effektorproteinen wie der PI₃-Kinase (PI₃K) ermöglicht wird. Hierdurch wird eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen in Gang gesetzt, die auf grundlegende Mechanismen wie beispielsweise das Wachstum der Zelle, den Metabolismus oder den Eintritt in den Zellzyklus großen Einfluss haben^{35–37}. Im Folgenden soll auf zwei Rezeptortyrosinkinasen besonders eingegangen werden, da sie durch Bestrahlung aktiviert werden können und einen großen Einfluss auf das Verhalten der Zelle nach Bestrahlung ausüben: der IGF-Rezeptor und der EGF-Rezeptor.

1.3.1 Insulin-like Growth Factor-Rezeptor (IGFR)

Die Liganden für die Insulin-like Growth Factor-Rezeptoren sind drei strukturell eng verwandte Peptide: Insulin, IGF-I und IGF-II. Sie können an drei transmembranäre Rezeptoren, den Insulinrezeptor, den IGF-I-Rezeptor und den IGF-II-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor binden und diese durch die Bindung aktivieren ³⁸.

Der IGF-I-Rezeptor und der Insulinrezeptor sind sich strukturell sehr ähnlich. Sie bestehen beide aus vier Untereinheiten, zwei extrazellulären α -Untereinheiten, die die jeweiligen Liganden binden und zwei transmembranären β -Untereinheiten, die eine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität aufweisen. ^{38,39}

Nach Bindung des extrazellulären Liganden wird durch die Autophosphorylierung des Rezeptors an intrazellulär gelegenen Tyrosinresten eine Bindung von Adapterproteinen wie beispielsweise aus der Insulinrezeptorsubstrat-Familie IRS-1 bis IRS-4 ⁴⁰ oder Shc⁴¹ ermöglicht. Diese

wiederum binden und aktivieren die PI_3 -Kinase, wodurch unter anderem eine Aktivierung der nachgeschalteten Proteinkinase B- und MAP-Kinase-Signalwege resultieren, welche jeweils die Zelle in Richtung Proliferation führen^{35,42}. Außerdem kann durch Bestrahlung eine direkte IGFR-Aktivierung ausgelöst werden, wodurch eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen nach der Bestrahlung resultiert. Dieser Effekt wird ebenfalls durch den PI_3K -MAP-Kinasen-Signalweg und p38 vermittelt^{30,43}.

1.3.2 Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR)

Der EGF-Rezeptor gehört zu einer strukturell eng verwandten Gruppe von vier Rezeptoren (HER-1/ErbB1, HER-2/neu/ErbB2, HER-3/ErbB3 und HER-4/ErbB4), die als Liganden den Epidermal Growth Factor (EGF) und den Tumornekrosefaktor α ($TNF\alpha$) binden. Durch die Bindung eines Liganden an den extrazellulären Anteil des Rezeptors wird eine Dimerisierung von zwei benachbarten Rezeptormolekülen und hierdurch eine Phosphorylierung und Aktivierung der Rezeptoren induziert. Der phosphorylierte EGF-Rezeptor aktiviert mehrere intrazelluläre Schlüsselenzyme wie die PI_3 -Kinase, die MAP-Kinase oder auch die Phospholipase C, welche dann Second Messengers wie 1,2-Diacylglycerol und Kalzium generieren und grundlegende Signalwege in Gang setzen²⁴. Diese Signalwege spielen, ähnlich wie die dem IGF-Rezeptor nachgeschalteten Signalwege, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Differenzierung und der Migration der Zelle, der Inhibierung der Apoptose und Förderung der Proliferation.

Eine besondere Rolle scheint der EGF-Rezeptor bei der Antwort der Zelle auf unspezifische Stressreize wie UV-Strahlung, Hypothermie, ionisierender Strahlung, Hypoxie und oxidativen Stress zu spielen³⁴. Diese Reize können, ebenso wie die Bindung der spezifischen Liganden, eine Autophosphorylierung und Internalisierung des EGF-Rezeptors induzieren. Der aktivierte EGFR wird sodann über Caveolae in den Zellkern transportiert, wo er als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene agiert³⁴. Hierbei dient er als Induktor vor allem für Proteine, die für das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus

verantwortlich sind, wie zum Beispiel Cyclin D1, und für Proteine, die für die DNA-Reparatur zuständig sind, wie beispielsweise die DNA-PK^{24,44}. Eine Hemmung des Transportes von aktiviertem EGFR nach Bestrahlung in den Zellkern (z. B. durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab²⁴) führt zu einer verminderten DNA-Reparatur durch die DNA-PK und dadurch zu einem verminderten Überleben der Zellen nach Bestrahlung⁴⁵. Der EGFR scheint auf mehreren Wegen die Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen nach Bestrahlung zu erhöhen. Zum einen über den gerade geschilderten Weg der verbesserten DNA-Reparaturmechanismen über die DNA-PK. Zum zweiten über die EGFR-vermittelte Aktivierung des PI₃K-Akt-Weges und konsekutiver Inhibierung von Bad und damit die Inhibierung der durch DNA-Schäden induzierten Apoptose während und nach des Zellzyklusarrestes. Und zum dritten scheint die EGFR-Aktivierung durch Bestrahlung den Tumorzellen nach Überwinden des Zellzyklusstopps einen Überlebensvorteil durch eine erhöhte Proliferationsrate über die Ras/Raf/Mek/ERK- und STAT-Signalwege zu ermöglichen²⁴.

1.4 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg

PI₃-Kinasen gehören zu einer evolutionär hochgradig konservierten Gruppe von intrazellulären Phospholipidkinasen. Bisher wurden drei Klassen der PI₃-Kinase identifiziert (PI₃-Kinase Klasse I, II und III), welche eine unterschiedliche Affinität zu Phospholipiden zeigen und verschiedene Signalwege kontrollieren³⁶.

In eukaryotischen Zellen ist vor allem die Klasse IA der PI₃-Kinasen für die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat als Reaktion der Zelle auf die Bindung von Wachstumsfaktoren an bestimmte Rezeptortyrosinkinasen von Bedeutung⁴⁶. Die PI₃-Kinasen der Klasse IA bestehen aus einer katalytischen p110-Untereinheit und einer regulatorischen p85-Untereinheit. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren stellt die regulatorische Untereinheit eine Inaktivierung der katalytischen Untereinheit sicher. Bei einer Bindung von Wachstumsfaktoren an RTK wie dem IGF-Rezeptor oder dem EGF-Rezeptor

erfolgt eine direkte Interaktion der regulatorischen p85-Untereinheit mit Phosphotyrosinresten der RTK oder mit Adapterproteinen wie beispielsweise dem aktivierten Protein Ras oder mit IRS-1. Hieraus resultiert eine Aktivierung der katalytischen p110-Untereinheit und die Phosphorylierung von $\text{PI}_{(4,5)}\text{P}_2$ zu $\text{PI}_{(3,4,5)}\text{P}_3$.

Proteine mit einer PH-Domäne (Pleckstrin Homology Domain) binden direkt an $\text{PI}_{(3,4,5)}\text{P}_3$ und akkumulieren somit in Regionen von aktivierten PI_3 -Kinasen. Beispielsweise haben sowohl die Proteinkinase B (PK-B/Akt) als auch die PDK-1 (PI_3 -Kinase Dependent Kinase 1) eine PH-Domäne. Durch die jeweilige Bindung an $\text{PI}_{(3,4,5)}\text{P}_3$ wird eine Phosphorylierung der PK-B durch die örtliche Nähe zur PDK-1 erleichtert³⁷.

Durch die Phosphorylierung wird die PK-B aktiviert und phosphoryliert ihrerseits nun eine Vielzahl von nachgeschalteten Effektorproteinen, die Einfluss auf den Zellzyklus, das Wachstum der Zelle, Eintreten in den Zellzyklus und Hemmung der Apoptose nehmen⁴². Beispielsweise wird die Glykogensynthasekinase inhibiert, wodurch die Hemmung von Cyclin D1 und cMyc wegfällt³⁷.

Die Umwandlung von PIP_2 zu PIP_3 wird durch die Lipidphosphatase PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) antagonisiert, die als PIP_3 -3'-Phosphatase fungiert⁴⁷. PTEN ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen^{37,48}, bei dem im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise p53 eine haploinsuffiziente Mutation für die Tumorgenese genügt^{36,46}. Durch eine Herunterregulierung von Cyclin D1 erfüllt PTEN eine kontrollierende Funktion bei der Progression von der G_1 in die S-Phase. Zusätzlich führt eine Aktivierung von PTEN zu einer Stabilisierung und einer Hemmung der Degradation von p27 und somit zu einem Arrest in der G_1 -Phase³⁶. Eine weitere Lipidphosphatase, SHIP (PIP_3 -5'-Phosphatase), terminiert die Aktivierung der PDK-1 und somit die Phosphorylierung der PK-B und weiteren Downstream-Targets der PI_3 -Kinase³⁶.

1.4.1 Serum and Glucocorticoid activated Kinase-1 (SGK-1)

Ein wichtiges Effektormolekül der PDK-1 ist die SGK-1 (Serum and Glucocorticoidactivated Kinase-1). Die SGK-1 übt einen großen Einfluss auf die verschiedensten zellulären Funktionen aus. Sie ist insbesondere in die Regulierung von Ionenkanälen und Transportern in der Zellmembran involviert, die unter anderem das Zellvolumen, den intrazellulären pH-Wert und das Membranpotential bestimmen ^{49–51}. Des Weiteren werden die spannungsaktivierten Kaliumkanäle $K_v1.3$, $K_v1.5$ und $K_v4.3$ durch die SGK-1 hochreguliert ⁵². Dieser Effekt wird zumindest teilweise über den Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor 2 (NHERF2) vermittelt, welcher den Transport von Kanal- und Transportproteinen in die Zellmembran mediert^{53,54}. In Fibroblasten von SGK-1-Knockout-Mäusen ist die Modifizierung der K_v -Kanalaktivität durch eine Stimulierung mit IGF-1 nicht mehr möglich⁵⁵.

1.5 Kaliumkanäle in der Zellmembran

Kaliumkanäle transportieren Kaliumionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten über Zellmembranen. Ein zentrales Strukturelement, das evolutionär stark konserviert und allen Kaliumkanälen gemein ist, ist die sogenannte K^+ Signature Sequence, die für eine Selektionsstruktur, den sogenannten Selectivity Filter, innerhalb der Kanalpore kodiert und die selektive Passage von K^+ verbunden mit der gleichzeitige Blockade von Na^+ sicherstellt⁵⁶. Die Leitfähigkeit von Kalium durch Kaliumkanäle erreicht trotz der gleichzeitigen Blockade von Natriumionen fast das Diffusionslimit für Kalium ⁵⁷.

Kaliumkanäle stellen mit über 70 bekannten Genloci die größte und vielfältigste Gruppe von Ionenkanälen im eukaryotischen Genom dar. Unter ihnen bildet die Familie der K_v -Kanäle, also der spannungsaktivierten Kaliumkanäle, die größte Untergruppe mit derzeit 39 bekannten Genen. Die verschiedenen Arten von Kaliumkanälen unterscheiden sich hauptsächlich über die Form der Aktivierung. So gibt es unter anderem spannungsaktivierte, ligandenaktivierte und kalziumaktivierte Kaliumkanäle ^{57,58}.

1.5.1 Aufbau und Einteilung der K_V-Kanäle

Die Diversität der K_V-Kanäle ist deutlich größer als man es allein aufgrund der Zahl der für sie kodierenden Gene erwarten würde. Dies beruht auf mehreren Faktoren. Zum einen besteht jeder K_V-Kanal aus vier Untereinheiten, die jeweils von einem Gen kodiert werden. Je nach Subgruppe des K_V-Kanals können dies Homotetramere, aber auch Heterotetramere aus verschiedenen Untereinheiten innerhalb einer K_V-Subfamilie sein, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheiden können. Zum anderen können Untereinheiten bestimmter K_V-Subfamilien als sogenannte Modifiers fungieren, die durch Heterotetramerbildung die Eigenschaften anderer Kanaluntereinheiten modifizieren können⁵⁸. Zudem können regulatorische Proteine wie bspw. β -Einheiten oder CaM (Ca²⁺/Calmodulin) an K_V-Kanäle binden und diese ebenfalls in ihren Eigenschaften verändern. Außerdem stellen unterschiedliche Splicing-Varianten und die posttranslationelle Modifikation der Kanäle bspw. durch Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder Palmytoilierung einen wichtigen Anteil zur biochemische Vielfalt der K_V-Kanäle dar^{59,60}.

Die vier Untereinheiten, die gemeinsam den Kanalkomplex bilden, bestehen jeweils aus sechs transmembranären Segmenten S1-S6 und besitzen einen Spannungssensor zwischen S1 und S4. Aus den Segmenten S5 und S6 besteht die eigentliche Kanalpore. Das N-terminale Ende von S1 fungiert als eine Art intrazellulär gelegener Blocker der Kanalpore⁶¹. Die Aktivierung des Kanals durch eine Depolarisation wird durch eine spannungsinduzierte Konformationsänderung der Kanaluntereinheiten bewirkt. Es zeigt sich ein transienter auswärts gerichteter Stromfluss nach der Kanalaktivierung und ein gegensinnig gerichteter Stromfluss nach Repolarisation (sogenannter On gating current bzw. Off gating current), welche sich in der Größe der Ladung entsprechen. Man geht davon aus, dass sich geladene Elemente der Kanaluntereinheiten im elektrischen Feld der Zellmembran bewegen und somit der On gating current bei Aktivierung und der Off gating current bei Repolarisation zustande kommen⁶². Diese geladenen Elemente der Kanaluntereinheiten entsprechen am ehesten dem S4-Segment, welches reich an positiv geladenen basischen Aminosäureresten ist. Mutationen, die die

positiven Ladungen in dieser Region eliminieren, verändern zum einen die Spannungsaktivierung der Kanäle und zum anderen die Größe und die Ladung sowohl des On gating current als auch des Off gating current⁶³. Die negativ geladenen Segmente 2 und 3 tragen ebenfalls zur spannungsabhängigen Aktivierung bei.

Spannungsaktivierte Kaliumkanäle weisen bei kontinuierlicher Stimulierung eine Konformationsänderung auf, die eine Inaktivierung des Kanals bewirkt⁶⁴. Diese unterscheidet sich vom geschlossenen Zustand des Kanals. Es existiert eine schnelle und eine langsame Inaktivierung. Für die schnelle Inaktivierung ist das N-terminale Ende von S1 zuständig, weshalb sie auch N-Inaktivierung genannt wird. Die langsame Inaktivierung beruht auf einer Konformationsänderung des äußeren Anteils des Selectivity Filters und wird C-Inaktivierung genannt. Für Kv1.3 ist eine sogenannte Use Dependent Inactivation bekannt. Dies bedeutet, dass der Kanal bei schneller repetitiver Stimulierung in den inaktiven Zustand übergeht und nicht mehr auf Depolarisationsreize reagiert ^{4,61}.

Die Gruppe der Kv-Kanäle kann aufgrund von Sequenzhomologien in 12 Subfamilien eingeteilt werden, die sich teilweise in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Die Subfamilien Kv5, Kv6.x, Kv8.x und Kv9.x stellen sogenannte Modifiers dar, die alleine nicht in der Lage sind, funktionelle Kanalkomplexe zu bilden. Sie bilden jedoch Heterotetramere mit Untereinheiten anderer Subfamilien (besonders Kv2.x) und verändern diese in ihren biochemischen Eigenschaften ⁵⁸.

1.5.2 Bedeutung der Kv-Kanäle für die Zelle

Kaliumkanäle sind neben den Funktionen im Rahmen der Exzitabilität bei neuronalen Zellen in viele grundlegende Prozesse der Zelle eingebunden. Sie haben Auswirkungen auf die Adhäsion und Migration sowie die Differenzierung der Zellen und die Regulierung der Transkription. Über die Steuerung des Membranpotentials beeinflussen sie maßgeblich die Kontrolle des intrazellulären Kalziumhaushaltes und des intrazellulären Kalziumsignallings⁸. Sie spielen – auch über die Beeinflussung des Kalziumhaushaltes – einerseits

eine essentielle Rolle für die Proliferation der Zelle und für das Fortschreiten im Zellzyklus, andererseits sind sie eng in die Regulation der Apoptose eingebunden^{17,65}.

Die Bedeutung der K_v-Kanäle im Rahmen der Zellzyklusprogression wird durch die Beobachtung untermauert, dass eine Stimulierung mit Wachstumsfaktoren wie IGF oder EGF eine Aktivierung von K_v-Kanälen bewirkt und dass in einer Vielzahl von Tumorzellen die Aktivität und die Expression von Kaliumkanälen stark erhöht sind^{66,67}. Damit übereinstimmend zeigt sich, dass eine Inhibierung von Kaliumkanälen zu einer Abnahme sowohl der physiologischen Proliferationsrate beispielsweise nach der Aktivierung von Lymphozyten als auch der pathologischen Proliferationsrate im Fall von entarteten Zellen bewirkt. Offensichtlich ist die Aktivierung von Kaliumkanälen notwendig, um im Zellzyklus voranzuschreiten, insbesondere für den Übergang von der G₁ zur S-Phase, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist⁶⁸. Dies wurde bereits in den 1980er Jahren für verschiedene Zelltypen im Rahmen der physiologische Zellteilung nach externer Stimulierung wie beispielsweise bei aktivierten B-Lymphozyten⁶⁹, bei Schwann-Zellen bei der sogenannten Wallerschen Degeneration⁷⁰, und initial in einer grundlegenden Arbeit zur Zellteilung nach Aktivierung von T-Lymphozyten⁶ gezeigt. Auch bei entarteten Zellen wie der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 konnte dieser Effekt bereits früh bestätigt werden⁷¹. Zum Teil lässt sich der Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und der Aktivierung von Kaliumkanälen über unspezifische Mechanismen wie beispielsweise die Regulierung des Membranpotentials erklären, welche eine grundlegende Voraussetzung für das geordnete Ablaufen von Stoffwechselprozessen, Signalwegen, der Differenzierung der Zelle und dem Zellzyklus im Allgemeinen darstellt^{5,8}. Es gibt allerdings in den letzten Jahren auch vielfältige Hinweise darauf, dass Kaliumkanäle von der reinen Kaliumleitfähigkeit unabhängigen Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation von Zellen nehmen können^{72–74}.

1.5.3 Funktionen der Kaliumkanäle

Das Membranpotential weist zyklische Veränderungen während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus auf ^{18,75}. So ist für die beiden wichtigsten Übergänge im Zellzyklus, nämlich von G_0 zu G_1 und von der frühen G_1 zur S-Phase eine Hyperpolarisation notwendig ⁵. Andererseits ist für den Übergang G_2 /M-Phase eine vorübergehende Depolarisation des Membranpotentials notwendig ^{18,75–77}. Durch die Inhibition von spannungsaktivierten Kaliumkanälen kann die Proliferationsrate sowohl bei entarteten als auch bei normalen Zellen gesenkt werden⁷⁸.

Im Allgemeinen besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und der Proliferationsrate von Zellen ⁷⁷. Ausdifferenzierte Zellen in G_0 haben ein stark hyperpolarisiertes Membranpotential, während Zellen, die ständig im Zellzyklus voranschreiten ohne in G_0 einzutreten (wie beispielsweise Tumorzellen), im Vergleich ein deutlich depolarisiertes Membranpotential aufweisen ^{79,80}. Eine Zwischenstufe stellen ruhende Zellen in G_0 dar, die, um aktiviert zu werden, eine Stimulierung durch Wachstumsfaktoren benötigen. In diese Gruppe gehören beispielsweise nicht aktivierte Lymphozyten, welche, relativ zu Tumorzellen gesehen, ein stärker hyperpolarisiertes Membranpotential aufweisen⁵. Die Inhibition von Kaliumkanälen führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials und wirkt somit der für den Eintritt in die G_1 -Phase notwendigen transienten Hyperpolarisation entgegen ⁵. Daher ist gerade bei schnell proliferierenden Zellen mit einem im Schnitt stärker depolarisierten Membranpotential eine höhere Expression und Aktivität von bestimmten Kaliumkanälen in der Zellmembran notwendig, um transiente Hyperpolarisationen, die für bestimmte Schritte im Zellzyklus notwendig sind, zu erreichen⁷⁸.

Eine Depolarisation des Membranpotentials durch eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums verursacht eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation in PHA-stimulierten PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)⁶⁸. Diese Inhibition findet je nach Zelltyp in der frühen bis mittleren G_1 -Phase statt und ist nach Normalisierung des extrazellulären Kaliumgehaltes vollständig reversibel. Die Hyperpolarisation scheint vor allem für die Regulierung des für

den Übergang G_0/G_1 und G_1/S -Phase notwendigen Kalziumeinstroms essentiell zu sein ^{5,8}.

Dieser findet zum einen über speicherabhängige Kalziumkanäle (I_{CRAC} , Ca^{2+} Release Activated Current) statt, welche während der gesamten Interphase und vor allem am Übergang G_1 zur S-Phase eine stark erhöhte Aktivität aufweisen. Der Kalziumeinstrom über I_{CRAC} wird durch eine Hyperpolarisation des Membranpotentials verstärkt und durch eine Depolarisation inhibiert ⁸¹. Eine Hemmung des I_{CRAC} führt zu einem Zellzyklusarrest ⁶⁶. Zudem wird über die Regulierung des Membranpotentials durch K_v -Kanäle die Aktivität von spannungsaktivierten Kalziumkanälen moduliert ⁷³.

Über die Hyperpolarisation des Membranpotentials wird zudem der für den Zellzyklus notwendige natriumgekoppelte Transport von metabolischen Substraten wie Aminosäuren und Glukose erleichtert. Hierdurch wird der elektrochemische Gradient für Na^+ erhöht und der gleichzeitige Ausstrom von K^+ garantiert somit die Elektroneutralität des Gesamttransports sowie eine konstante zytosolische Osmolarität^{5,82}.

Ein weiterer Mechanismus, über den Kaliumkanäle direkt mit dem Zellzyklus verbunden sind, stellt die Steuerung des Zellvolumens dar. Für die Regulierung des Zellvolumens sind hauptsächlich Cl^- -Kanäle im Zusammenspiel mit K^+ -Kanälen verantwortlich⁶⁶. In der G_1 -Phase findet physiologischerweise eine gewisse Zunahme des Zellvolumens statt ²⁰. Durch eine unregelte Zunahme des Zellvolumens kann allerdings die Proliferation von Zellen auch gehemmt werden, was einen direkten, am ehesten biphasischen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen nahelegt. In Gliomzellen konnte gezeigt werden, dass die höchsten Proliferationsraten in einem sehr eng begrenzten Fenster des Zellvolumens erreicht werden ¹⁹. Das Zellvolumen hat unter anderem durch die Konzentration an löslichen Stoffen und an Regulatoren des Zellzyklus Einfluss auf die Proliferation ^{8,21}.

Allerdings stellt sich die Frage, ob der Einfluss von Kaliumkanälen auf das intrazelluläre Signalling und den Zellzyklus nur durch die eben beschriebenen,

eher unspezifischen Effekte zurückzuführen ist oder ob nicht noch weitere, von der Funktion als Kaliumleitstruktur in der Zellmembran unabhängige Eigenschaften der Kaliumkanalproteine spezielle Funktionen im Signalling übernehmen. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstrichen, dass eine Mutation des onkogenen Kanals $K_v10.1$, die die Kaliumleitfähigkeit des Kanals aufhebt, zwar die Tumorgenese abschwächt, aber nicht komplett aufhebt^{7,8}.

Zudem spielen K_v -Kanäle eine wichtige Rolle im kontrollierten Zelltod. Während der Apoptose kommt es zu einer Abnahme des intrazellulären Kaliums und des Zellvolumens. Gleichzeitig ist die sinkende Kaliumkonzentration in die Aktivierung von Caspasen involviert⁸³. Die Tatsache, dass Kaliumkanäle in so gegensätzlichen Abläufe wie einerseits der Zellzyklusprogression und andererseits dem Zelltod eine wichtige Rolle spielen, weist daraufhin, dass diese Funktionen nicht nur durch den reinen Kaliumausstrom vermittelt sein können^{72,83}. In Fibroblasten und Myoblasten konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion mit K_v10 eine stark erhöhte Zellproliferation bewirkt. Dieser Effekt kam auch durch Transfektion mit K_v10 -Kanälen zustande, die eine Mutation in der Selectivity Filter Region aufweisen und somit keine Kaliumleitfunktion mehr besitzen^{7,73}. Zudem haben spannungsaktivierte Kaliumkanäle Bindungsstellen für wichtige Effektorproteine des intrazellulären Signallings. So kann aus der direkten Interaktion der Effektoren mit den Kanalproteinen eine gegenseitige Aktivierung resultieren⁷³. K_v10 beispielsweise kann die CaMK II binden, was zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms führt. $K_v1.3$ wiederum kann eine enge physikalische Bindung mit β -Integrinen eingehen, welche eine wichtige Funktion in Zell-Zell-Interaktionen haben und unter anderem Auswirkungen auf das Zellwachstum und Überleben haben. $K_v1.3$ weist außerdem eine Bindungsstelle für $p56^{lck}$ auf, welches zur Familie der Src-Proteinkinasen gehört⁷².

1.6 Rolle von Kalziumkanälen im Zellzyklus

Der Zellzyklus hängt stark von Veränderungen des intrazellulären Kalziumgehaltes ab. Sowohl durch eine Absenkung der extrazellulären

Kalziumkonzentration unter einen bestimmten Schwellenwert als auch durch eine Blockade von Kalziumkanälen kommt es zu einer Akkumulation von Zellen in der G₁-Phase⁸⁴. Sobald den Zellen Kalzium zugeführt wird, kommt es wiederum zu einem Fortschreiten im Zellzyklus⁸⁵. Hierbei konnte gezeigt werden, dass normale Zellen stärker von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig sind, um im Zellzyklus voranzuschreiten als transformierte, präneoplastische und neoplastische Zellen^{85,86}. Es reagieren hauptsächlich zwei Abschnitte im Zellzyklus sensibel auf die Kalziumdepletion: die frühe G₁-Phase und ein Zeitpunkt vor der Transition G₁/S-Phase. Nach Voranschreiten des Zellzyklus über diesen Zeitpunkt hinweg hat eine Kalziumdepletion keinen Effekt mehr auf den Übergang G₁/S-Phase und den weiteren Zellzyklus⁸⁷.

Intrazelluläres ungebundenes Kalzium ist für jede Zelle von vitaler Bedeutung. Viele essentielle Signalwege werden über Kalziumsignale vermittelt¹⁷. Die Information, die durch Kalziumsignale übertragen wird, beruht auf der Höhe, der zeitlichen und der örtlichen Komponente von Kalziumoszillationen sowie der Lokalisation und Sensitivität der nachgeschalteten Signalproteine^{65,88}. Zwischen der intrazellulären und der extrazellulären Kalziumkonzentration besteht ein Konzentrationsgefälle, das über komplexe und energieverbrauchende Prozesse aufrechterhalten wird. Hierzu gehören unter anderem die Aktivität der membranständigen Ca²⁺-ATPase, des Na⁺/Ca²⁺-Austauscher und die intrazelluläre Ca²⁺-Sequestrierung (über die Aktivität der SERCA, Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase)⁸⁹. Kalzium hat sowohl vom Extrazellulärraum als auch aus den intrazellulären Speicherorganellen, allen voran dem ER, das Bestreben, in das Zytosol einzudringen^{17,89}. Da stets ein geringer Leckstrom von Kalzium in das Zytoplasma besteht, pumpt die Zelle über energieverbrauchende Ionentransporter ständig Kalzium aus dem Zytoplasma heraus. Der intrazelluläre Kalziumspiegel muss immer in einem engen Rahmen gehalten werden, da einerseits zu hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen toxisch sind und die Zelle in die Apoptose führen. Andererseits werden über Kalzium als Second Messenger grundlegende intrazelluläre Signalkaskaden mit

entscheidendem Einfluss auf die Proliferation, Migration, Adhäsion, Aktivierung und Differenzierung der Zelle reguliert ¹⁷. Über spezialisierte Kalziumkanäle in der Zellmembran werden Kalziumsignale örtlich und zeitlich übermittelt. Hierbei spielen je nach Zelltyp spannungsaktivierte, ligandenaktivierte, dehnungsaktivierte, rezeptorgekoppelte und second-messenger-aktivierte Kalziumkanäle eine große Rolle ⁹⁰.

Die Zelle hat komplexe Mechanismen entwickelt, um durch einen kontrollierten Kalziumeinstrom von extrazellulär, dem sogenannten Store Operated Calcium Entry (SOCE), depletierte intrazelluläre Speicher wieder aufzufüllen ^{87,90,91}. Einen Anteil an SOCE bildet der Ca^{2+} Release Activated Current (I_{CRAC}). Die molekulare Grundlage für I_{CRAC} bilden ein Komplex aus zwei Molekülen, STIM1 und Orai1. STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) befindet sich in der Membran des ER und stellt mittels seiner EF-Handsequenz (Kalzium-bindende Sequenz ^{17,65}) einen Sensor für den Kalziumspiegel des ER dar. Auf eine Entleerung der Kalziumspeicher im ER hin kommt es zu einer Clusterbildung von STIM1-Molekülen in der Membran des ER. Diese formatieren sich an bestimmten Stellen der Membran des ER, an denen diese direkt unterhalb der Zellmembran zu liegen kommt. Hierdurch wird eine gleichartige Clusterbildung von Orai1-Molekülen in der Zellmembran induziert, wodurch es zu einer Aktivierung von Orai1 und einem Kalziumeinstrom durch Orai1 in das ER kommt ⁹⁰. Der I_{CRAC} ist während der gesamten Interphase aktiv und zeigt eine maximale Aktivierung beim Übergang von der G_1 zur S-Phase. Während der Mitose selbst wiederum konnte eine Hemmung des I_{CRAC} nachgewiesen werden, was man sich mit der Komplexität der Kalziumsignale in der M-Phase erklärt, für die der Kalziumeinstrom über I_{CRAC} nicht genau genug zu regulieren ist ^{87,90}. Ein Knockout von Orai1 und damit eine Hemmung des SOCE führt zu einem Zellzyklusarrest und deutlich verminderten Proliferationsraten in verschiedenen Zellreihen ⁸⁶. Wie bereits erwähnt, scheinen insbesondere der Übergang von G_1 zur S-Phase und die frühe G_1 -Phase vulnerabel auf den Entzug von Kalzium zu sein ⁹⁰. Diese werden unter anderem über die Aktivierung der Calcium/Calmodulin stimulated proteinkinase (CaMK) I und II

vermittelt, die eine zentrale Rolle in der Progression durch die G₁- und die M-Phase spielen ⁹².

1.7 Calcium/Calmodulin stimulated protein Kinasen (CaMK)

Der wichtigste Kalziumsensor in der Zelle ist Calmodulin, ein Protein, das evolutionär hoch konserviert ist und mittels seiner EF-Hand-Sequenz in der Lage ist, Kalzium zu binden und dadurch aktiviert wird ¹⁷. Die durch die Bindung von Ca²⁺/Calmodulin aktivierten CaMK nehmen über die Regulierung von promitotischen und antimitotischen Signalproteinen wie Cyclinen und Rb großen Einfluss auf den Zellzyklus⁹³. So reguliert die CaMK I den G₁/S-Phase-Übergang, während die CaMK II den Übergang von G₂/M und Metaphase/Anaphase reguliert. Durch Inhibierung der CaMK I kommt es zu einem Arrest der Zelle in G₁. Die Aktivierung der CaMK II hingegen ist für die Progression der Zelle durch die G₂-Phase und die M-Phase, genauer den Übergang der Anaphase zur Metaphase, essentiell. Eine Überexpression von CaMK II führt zu einer erhöhten Zellteilungsrate, während eine Inhibierung zu einer Akkumulation von Zellen in G₂ führt⁹⁴.

Der Übergang von G₂ zur M-Phase wird in eukaryotischen Zelle durch den Mitoosis Promoting Faktor (MPF) reguliert, der aus dem Komplex von Cdk1 und Cyclin B besteht. Während der Interphase wird dieser Komplex durch die inhibitorische Phosphorylierung von Cdk1 inhibiert. Diese Phosphorylierung wird durch die Cdc25C Checkpoint Phosphatase aufgehoben, sodass der MPF aktiviert wird und den G₂/M Übergang ermöglicht. Die CaMK II kann sowohl eine aktivierende als auch eine inhibierende Phosphorylierung von Cdc25C bewirken ⁹⁴. Die CaMK II spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Polymerisation von Mikrotubuli während der Anaphase. Eine Herunterregulierung von CaMK II führt zu einer Akkumulation von Zellen in der Prometa- und Metaphase und einer Anhäufung von Zellen mit multipolaren Spindelapparaten, was verdeutlicht, dass die CaMK II für die regelrechte Spindelformatierung in der Mitose notwendig ist. In all diesen Wegen der

Einflussnahme auf die Zellzyklusprogression durch die CaMK ist die Bindung von Kalzium an Calmodulin der entscheidende Faktor⁹⁴.

1.8 Zusammenhang von K_v-Kanälen und dem Kalziumhaushalt

Wie bereits erwähnt scheint eine transiente Hyperpolarisation des Membranpotentials für die Regulierung des für den Übergang G₀/G₁ und G₁/S-Phase notwendigen Kalziumeinstroms essentiell zu sein^{5,8}. Dieser kommt zum einen über die Aktivität von spannungsaktivierten Kalziumkanälen zustande, welche wiederum über die Regulierung des Membranpotentials durch K_v-Kanäle moduliert werden⁷³. Je hyperpolarisierter das Membranpotential ist, desto höher ist der elektrische Gradient, der Kalzium in die Zelle treibt. Zum anderen ist ein über speicherabhängige Kalziumkanäle (I_{CRAC}) gesteuerter Kalziumeinstrom für das Fortschreiten im Zellzyklus notwendig⁸⁷. Für den Kalziumeinstrom über I_{CRAC}, welcher vor allem während der Interphase und dem Übergang G₁ zur S-Phase eine stark erhöhte Aktivität aufweist, ist ein hyperpolarisiertes Membranpotential ebenfalls notwendig. Eine Hemmung des I_{CRAC} führt zum Zellzyklusarrest⁶⁶. In HEK 293-Zellen konnte durch eine Stimulierung mit IGF-1 über die Aktivierung der PI₃-Kinase eine K_v-Kanal-abhängige Erhöhung des Kalziumeinstroms über I_{CRAC} und eine nachfolgende Erhöhung der Proliferationsrate nachgewiesen werden. Der proliferative Effekt von IGF-1 konnte zum einen durch spezifische K_v-Kanal-Inhibitoren und zum anderen über PI₃-Kinase-Inhibitoren ausgelöscht werden^{52,81}.

1.9 Hypothese

Bisher noch kaum erforscht ist die Wechselwirkung von Bestrahlung und spannungsaktivierten Kaliumkanälen. Es ist bekannt, dass Bestrahlung zu einer Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie den IGF-Rezeptor und den EGF-Rezeptor in der Zellmembran führt^{31,82}. In HEK 293-Zellen konnte gezeigt werden, dass der proliferative Effekt der Aktivierung des IGF-Rezeptors durch die Supplementierung von IGF-1 über die Aktivierung von K_v-Kanälen und die konsekutive Erhöhung des I_{CRAC} vermittelt ist^{52,81}. Das Ziel der vorliegenden

Dissertation ist es, die Effekte von Bestrahlung auf spannungsaktivierte K_v-Kanäle in der Zellmembran von HEK 293-Zellen und die Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt sowie die Zellzyklusprogression der Zellen zu beschreiben.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die Zelllinie HEK 293 (Human Embryonic Kidney Cells) als eine transformierte Zellreihe aus embryonalen menschlichen Nierenzellen wurde zu allen Experimenten verwendet. HEK 293-Zellen exprimieren konstitutiv die Kaliumkanalproteine K_v1.1-4, K_v3.1 und K_v3.4⁵².

Die Zellen wurden in RPMI-Medium 1640 (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom AG, Art.Nr. S0615 / FBS Superior) versetzt bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Vor dem Erreichen eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen umgesetzt. Dafür wurde das alte Medium abpipettiert, die Zellkultur mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen und mit Trypsin (Invitrogen, Art.Nr. 25300) abgelöst. Nach ca. 3 Minuten wurde die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Von dem verbliebenen Zellpellett wurden ca. 1 Mio Zellen in frischem, auf 37 °C angewärmten Medium in Zellkulturflaschen wieder ausgesät.

2.1.1 Einfrieren und Auftauen

Das Einfriermedium bestand aus 80 % Kulturmedium, 10 % FCS und 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, D2650). Es wurden 5 Mio Zellen in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und über 24 Stunden in Isopropanol gelagert auf -20 °C gekühlt. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen von Zellen fand im Wasserbad bei 37 °C statt. Das DMSO-haltige Einfriermedium wurde entfernt, die Zellen wurden mit normalem Kulturmedium gewaschen und mit nochmals 10 % FCS-versetztem Medium einmalig umgesetzt bevor sie zu Versuchsansätzen verwendet wurden.

2.1.2 Bestrahlen der Zellen

Die Zellen wurden mit einem Linearbeschleuniger (LINAC SL25 Philips) mit 6 MV-Photonen mit einer Dosisrate von 4 Gy/min bei Raumtemperatur bestrahlt. Direkt vor der Bestrahlung wurde ein Kulturmediumwechsel durchgeführt. Je nach Versuchsansatz wurde mit 0 Gy, 1 Gy, 5 Gy oder 10 Gy bestrahlt. Die Kontrollansätze (0 Gy) wurden in den Vorraum des

Linearbeschleunigers mitgenommen, um einen Einfluss des Transportes und der veränderten äußerlichen Bedingungen (Raumtemperatur, niedrigerer CO₂-Gehalt und Luftfeuchtigkeit) auf die Messergebnisse auszuschließen. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung sofort wieder in den Brutschrank gestellt.

2.2 Durchflusszytometrie

Um den Einfluss der Bestrahlung der Zellen hinsichtlich des Zellzyklus und des Zelltodes zu beurteilen, wurde die Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) eingesetzt. Hierbei werden die Zellen zunächst vereinzelt, in Suspension gebracht und durch ein Kapillarröhrchen gesaugt. In dem Kapillarröhrchen passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl, der in Abhängigkeit von der Zellgröße (FSC, Forward Scatter) und ihrer Granularität sowie der Beschaffenheit des Zellkerns (SSC, Sideward Scatter) abgelenkt wird. In einem Dot-Plot-Diagramm kann man nun die Zellen nach Größe und Granularität auftragen. Durch zusätzliche Färbungen beispielsweise von DNA durch Propidiumiodid kann man eine Zuteilung der Zellen in die einzelnen Phasen des Zellzyklus erreichen und zudem tote von vitalen Zellen abgrenzen.

Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich unselektiv in DNA-Stränge einlagert und hierdurch ermöglicht, auf den DNA-Gehalt der Zelle zu schließen. Damit das Propidiumiodid (PI) in den Zellkern und auch in DNA-haltige Vesikel bereits apoptotischer Zellen eindringen kann, versetzt man die Lösung mit einem Detergenz (Nicoletti et al. 1991). Wenn PI an die DNA gebunden hat, kann man durch eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm eine Emission der Wellenlänge 564-606 nm erreichen. Durch die Intensität der Emission kann man auf den DNA-Gehalt der Zelle schließen. In Abhängigkeit der drei Größen DNA-Gehalt, Zellgröße und Granularität der Zellen kann man dann wiederum Rückschlüsse auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus ziehen.

Es werden hierbei mehrere verschiedene Zellpopulationen unterschieden: die G₁-Population mit noch nicht replizierter DNA, die G₂-Population mit einem doppelten Chromatidensatz, Zellen in der S-Phase, die zwischen beiden liegt,

die SubG₁-Population und die HyperG-Population, wobei die SubG₁-Population toten Zellen und die HyperG-Population polyploiden Zellen entspricht.

Die Zellen wurden nach der Bestrahlung für 24 Stunden und 48 Stunden in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Es wurden jeweils 3 Versuchsansätze mit je 3 Wells für 24 h und 48 h mit 0, 1, 5, 10 Gy Bestrahlung und mit dem K_v-Kanalinhibitor TEA (0, 1, 5, 10 mM) (T2265, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) durchgeführt. Für die Versuchsansätze für die Messung 24 Stunden nach Bestrahlung wurden 1 x 10⁶ Zellen pro Ansatz und für die Messung 48 Stunden nach Bestrahlung 1x 10⁵ Zellen pro Ansatz ausgesät. Das TEA wurde 1 Stunde vor der Bestrahlung bei einem Mediumwechsel hinzugegeben. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, abtrypsiniert und die Reaktion mit RPMI-Medium mit 1 % FCS abgestoppt. Danach wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5 Minuten ohne Abbremsen abzentrifugiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt mit PI-Lösung gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde sodann wie oben beschrieben im Fluoreszenzkanal FL-2 (logarithmische Skala, 564-606 nm Emissionswellenlänge) gemessen (FACS Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, 488 nm Anregungswellenlänge). Die SubG₁-Population im PI-Histogramm wurde als die Fraktion apoptotischer Zellen mit degradiertem DNA definiert. Die Daten wurden mittels FCS Express 3 Software analysiert (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.2.1 Nicoletti-Färbung:

5 ml 0,1 % NaCitrat

50 µl 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, T9284)

50 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, P4864)

2.3 Western Blot

HEK 293-Zellen wurden für 12 Stunden in serumfreien Medium kultiviert und danach entweder 5 Minuten vor der Bestrahlung mit 1 % FCS stimuliert oder serumdepletiert mit 0 Gy, 1 Gy oder 5 Gy bestrahlt. Sie wurden sodann für

1 Stunde mit 1 % FCS oder weiterhin serumdepletiert inkubiert, danach abtrypsiniert und mit Lysepuffer lysiert (Zusammensetzung s. u.). Die Proteine wurden unter reduzierenden Konditionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen elektrotransferiert (Roth, Karlsruhe). Die Membranen wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur in mit 0,05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, P2287) und 5 % Trockenmilchpulver (Roth, Karlsruhe, T145.3) versetztem TBS-Puffer geblockt und über Nacht bei 4 °C mit folgenden Antikörpern inkubiert:

1. Anti-Phospho-SGK-1 #36-002 (Ser255/Thr256, rabbit) Lot #22437 (upstate cell signaling solutions, Lake Placid, NY)
 2. Anti-SGK-1 # 07-315 (Aminosäuren 399-412 C-GKSPDSVLVTASVK, rabbit) Lot #26066 (upstate cell signaling solutions, Lake Placid, NY)
 3. Anti-Phospho-IGF1 Rezeptor (phospho Y1158 + Y1162 + Y1163) (ab5681, rabbit), (Abcam, Cambridge, UK)
 4. Anti-IGF1 Rezeptor [1H7] (ab986, mouse), (Abcam, Cambridge, UK)
- (Antikörper jeweils 1:1000 Verdünnung in TBS-Tween mit 5 % Trockenmilchpulver)

Die gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit Proteinlysate wurde durch einen Antikörper gegen β -actin (mouse anti- β -actin antibody, clone AC-74, Sigma #A22281:50,000) verifiziert. Die spezifische Antikörperbindung wurde mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper von der Ziege gegen Kaninchen- oder Maus-IgG-Antikörper detektiert (Cell Signaling #7074 und #7076, New England Biolabs, 1:1000 und 1:2000 Verdünnung in TBS-Tween mit 5 % Trockenmilchpulver, Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur). Es folgte die Zugabe von ECL (Enhanced Chemoluminescence, ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare/Amersham-Biosciences, Freiburg) und die Detektion der Banden mittels Filmentwicklung, semiquantitative Analyse mittels Densitometrie.

2.3.1 Lysepuffer:

50 mM HEPES/NaOH pH 7.5

150 mM NaCl
1 mM EDTA/Na
10 mM Na Pyrophosphat
10 mM NaF
2 mM Na₃VO₄
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 % Triton X-100, 5 µg/ml
Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 3 µg/ml Pepstatin

2.4 Patch Clamp-Messungen

Die Patch clamp-Technik ist ein elektrophysiologisches Verfahren, mit dem man elektrische Ströme und Spannungspotentiale über Teile der Membran oder über die gesamte Membran einer Zelle messen kann. Das Verfahren wurde von Bert Sakmann und Erwin Neher in den siebziger Jahren auf der Grundlage der sogenannten Spannungsklemme von Kenneth S. Cole und H. J. Curtis etabliert⁹⁵.

Mithilfe einer Glaspipette, deren Öffnung dicht auf die Zellmembran aufgesetzt und auf die ein leichter Unterdruck appliziert wird, wird der Membranbereich unter der Pipettenspitze in die Spitze eingesaugt und dabei elektrisch gegen die Umgebung isoliert. Hierbei werden Widerstände im Gigaohmbereich erreicht, die notwendig sind, um Ströme im pikoAmpere-Bereich aufzuzeichnen. Außerdem werden hierdurch sich Leckströme (Leak) verringert⁹⁵. Durch Applizieren eines kurzen Saugunterdruckes oder von Stromstößen erreicht man, dass die Membran unter der Pipettenspitze rupturiert und man nun einen elektrischen Zugang zum Zellinneren erhält. Dieser sogenannte Ganzzellmodus ermöglicht, dass man Ionenströme, die über die Zellmembran fließen, aufzeichnen kann. Zudem kann man die Zusammensetzung der intrazellulären Flüssigkeit kontrollieren, denn nach kurzer Zeit wird durch Diffusion die intrazelluläre Flüssigkeit durch die genau definierte Pipettenlösung ersetzt. Zur Messung der Ströme bedient man sich einer mit Silberchlorid beschichteten Silberelektrode, die sich in der Pipettenlösung befindet und einer zweiten Elektrode, die sich in der Badlösung befindet⁹⁵.

Die Messungen wurden bei 37 °C an einzelnen Zellen durchgeführt. Es wurde ein Zeiss Axiovert 100 Mikroskop sowie ein elektrischer Mikromanipulator (STM Lang GmbH and Co. KG, Germany) verwendet. Die Messungen wurden mit einem Verstärker (EPC-9 Verstärker Heka, Lambrecht, Germany) durchgeführt und die Pulse Software (Heka) und das ITC-16 Interface (Instrutech, Port Washington, NY, USA) verwendet, um die Spannungspulsprofile zu erstellen und die Stromableitungen durchzuführen.

Die Zellen wurden während den Messungen in der Petrischale (Badvolumen ca. 100 µl) kontinuierlich mit 37 °C warmer physiologischer Badlösung überspült. Es wurde mit Borosilikatpipetten (GC150 TF-10, Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland), die für jede Messung mittels eines Kapillarziehgerätes (DMZ Puller Zeitz, Augsburg, Germany) neu hergestellt wurden, ein Gigaohm-Seal (8-14 GΩ) hergestellt.

Durch Applizieren eines abrupten Unterdruckes wurde die Zellmembran der Zelle rupturiert und somit eine Ganzzellableitung ermöglicht. Das Membranpotential wurde initial auf -70 mV geklemmt. Von -70 mV wurde das Membranpotential auf -100 mV für 200 msec verringert und in 20 mV-Schritten auf +100 mV bewegt. Um eine Use Dependent Inactivation von Kaliumkanälen zu vermeiden (wie bei $K_v1.3$ beschrieben⁵⁸), wurde zwischen den einzelnen Spannungssprüngen jeweils für 20 Sekunden das ursprüngliche Haltepotential von -70 mV hergestellt.

Um sicher zwischen einem Kaliumausstrom und einem Chlorideinstrom, welche im Netto-Stromfluss gleich sind, unterscheiden zu können, wurde in mehreren Messungen zusätzlich eine chloridfreie Badlösung verwendet.

Um die für die Stromkurven verantwortlichen Kaliumkanäle genauer spezifizieren zu können, wurden verschiedene Kaliumkanalblocker verwendet. Zum einen wurde der relativ unspezifische K_v -Kanalinh inhibitor TEA (Tetraethylammoniumchlorid) verwendet, welcher von extrazellulär in verschiedenen Konzentrationen reversibel die Kaliumkanäle K_v1-3 , $K_v4.1$, $K_v7.2-5$ hemmt ^{52,58}. Zum anderen wurden sehr spezifische K_v -Kanalinh inhibitoren verwendet, wie beispielsweise Margatoxin (Hemmung von $K_v1.1-3$) oder

Agitoxin (Hemmung von $K_v1.3$). Mit diesen wurden nach einem ersten Messzyklus in unterschiedlichen Konzentrationen die Zellen superfundiert.

2.4.1 Badlösung (Lösung 1)

125 mM NaCl
32 mM HEPES/ NaOH (pH 7,4)
5 mM KCl
5 mM D-Glucose
1 mM CaCl_2
1 mM MgSO_4

2.4.2 Chloridfreie Badlösung

125 mM Na^+ -D-Gluconat
32 mM HEPES/ NaOH (pH 7,4)
5 mM K^+ -D-Gluconat
5 mM D-Glucose
1 mM $\text{Ca}^{2+}(\text{D-Gluconat})_2$
1 mM MgSO_4

2.4.3 Pipettenlösung

140 mM K^+ -D-Gluconat
5 mM HEPES/KOH pH 7,4
5 mM MgCl_2
1 K_2 -EGTA
1 K_2 -ATP

Die Badlösung wurde steril filtriert, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und in 50 ml Aliquots aufgeteilt. Diese wurden bei Raumtemperatur gelagert. Die Pipettenlösung wurde in 1 ml Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.4.4 Tetraethylammoniumchlorid

Eine 1M Stocklösung (T2265, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurde in Lösung 1 steril zu 0,3 mM, 1 mM, 3 mM und 10 mM Lösungen verdünnt. Diese wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.5 Margatoxin und Agitoxin

Es wurde eine sterile 0,01 mM Stocklösung (jeweils Sigma Aldrich, St. Louis, USA, M8437 und A9219) in destilliertem Wasser hergestellt und bei -20 °C gelagert. Zu den Messungen wurden Konzentrationen von 1 nM bis 100 nM in Lösung 1 hergestellt.

2.5 Calciumimaging

Das Calcium-Imaging ist eine fluoreszenzmikroskopische Methode, mittels derer der freie zytosolische Kalziumgehalt gemessen werden kann. Dazu benutzt man Fluoreszenzfarbstoffe, hier FURA-2, welches je nach Bindungszustand an Kalziumionen nach Anregung in den Wellenlängen 340 nm bzw. 380 nm Licht von der Wellenlänge 510 nm emittiert. FURA-2 wird als Methylester in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär wird der Methylrest durch Esterasen abgespalten, sodass die Bindungsstelle für Kalzium freiliegt. Wenn die Bindung von Kalzium an FURA-2 erfolgt ist, kann der Komplex die Zelle nicht mehr verlassen.

An Kalzium gebundenes FURA-2 hat ein Absorptionsmaximum bei ca. 340 nm, während ungebundenes FURA-2 bei 380 nm Anregungswellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweist. Es wird nun der ratiometrische Quotient aus den Fluoreszenzemissionsintensitäten von 340 und 380 nm gebildet und anhand der Änderung des Quotienten kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration ermittelt werden ⁹⁶.

Die Zellen wurden 2-3 Tage vor den Messungen in 3,5 cm Petrischalen ausgesät, sodass sie am Versuchstag zu 60-70% konfluent waren. Im Boden dieser Petrischalen befand sich ein Loch, das von der Unterseite mit einem

Deckglas verschlossen war (Glass Bottom Dish, Lot # 150906, Cellvis, California).

Nach der Bestrahlung wurde das serumhaltige Kulturmedium abpipettiert und durch serumfreies Medium, das mit 1 μ M FURA-2 (FURA-2/AM Molecular Probes, Göttingen) sowie zur besseren Löslichkeit des Farbstoffes mit 1 μ M Pluronic F-127 (10 % in H₂O, PromoKine, Heidelberg) versetzt war, ersetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten abgedunkelt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor der Messung wurde das Medium mit der Färbelösung abpipettiert und die Zellen mit 10 ml auf 37 °C angewärmter Badlösung (Zusammensetzung s. Patch Clamp-Messungen Lösung 1) überspült, um überschüssige Farbstoffreste aus der Petrischale zu entfernen. Die Messungen wurden mit einem Inversmikroskop durchgeführt (Axiovert 100; Zeiss, Oberkochen, Germany). Die Anregungswellenlänge betrug abwechselnd 340 nm und 380 nm. Sowohl die Exzitation als auch die Emission wurden durch einen dichromatischen Spiegel (409/LP nm beamsplitter, AHF) in das Kameraobjektiv (Fluar x40/1.30 Ölimmersionsobjektiv, Zeiss; Kamera von Visitron Systems) weitergeleitet. Die Datenauswertung erfolgte mittels der Metafluor Computer Software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA).

Zuerst folgten 10 Messungen mit Lösung 1 im Abstand von je 10 Sekunden, damit ein stabiles Steady State bei Anwesenheit von Kalzium gemessen werden konnte. Danach wurde die kalziumfreie Lösung 2, je nach Ansatz mit oder ohne TEA (10 mM), eingespült und die Messungen erfolgten im Abstand von 4 Sekunden, um schnellere Änderungen des Kalziumgehaltes aufzeichnen zu können. Nachdem sich ein Steady State in der kalziumfreien Lösung eingestellt hatte, wurde wiederum Lösung 1, je nach Ansatz mit oder ohne TEA (10 mM), hinzugegeben. Nach 30 Messungen im Abstand von je 4 Sekunden und 10 Messungen im Abstand von je 10 Sekunden wurde die Messung beendet. Zur Auswertung wurde das Ratio 340 nm/380 nm berechnet.

2.5.1 Kalziumfreie Lösung (Lösung 2)

125 mM NaCl

32 mM HEPES

5 mM KCl

5 mM D-glucose

1 mM MgCl_2

0,6 mM EGTA

Die Lösung wurde steril filtriert, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, in 50 ml Aliquots aufgeteilt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.6 Statistik

Die angegebenen Daten entsprechen, wenn nicht anders bezeichnet, dem Mittelwert \pm Standardfehler (SE). Unterschiede zwischen zwei experimentellen Gruppen wurden mittels Student t-Test (Welch-korrigiert bei unterschiedlichen Standardabweichungen) auf Signifikanz getestet. Experimente mit multiplen Paarvergleichen wurden mit parametrischen ANOVA auf signifikante Unterschiede überprüft und die Signifikanzwerte einzelner Paarvergleiche nach Tukey-Kramer berechnet. Bei sich unterscheidenden Standardabweichungen im multiplen Paarvergleich wurden die Gruppen mit nicht-parametrischem ANOVA (Kruskal-Wallis Test) verglichen und die Signifikanzwerte nach Dunn berechnet. P-Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Zellzykluskontrolle durch K⁺-Kanäle

Nach Bestrahlung wird über die Aktivierung des DNA Damage Response ²⁵ ein temporärer Stopp im Zellzyklus zur Reparatur der durch die Bestrahlung entstandenen DNA-Schäden induziert ^{26,27}. Um herauszufinden, ob spannungsaktivierte Kaliumkanäle eine Rolle in der Induktion oder auch in der Beendigung dieses Zellzyklusarrestes spielen, haben wir FACS-Experimente nach Bestrahlung mit 5 Gy mit und ohne Kaliumkanalinhibition durchgeführt. Um eine Zuordnung zu den bestimmten Phasen des Zellzyklus zu erreichen, färbten wir die Zellen mit Propidiumiodid, welches sich unselektiv in DNA-Stränge einlagert. Über die Färbung mit Propidiumiodid, die Größe der Zellen und die Beschaffenheit des Zellkerns kann man die Zellen zu den bestimmten Phasen des Zellzyklus zuteilen (s. Material und Methoden Abschnitt Durchflusszytometrie).

In unseren FACS-Messungen nach Bestrahlung der HEK 293-Zellen mit 5 Gy zeigte sich innerhalb von 24 Stunden nach Bestrahlung eine Verdopplung der Zellen in der G₂-Phase im Vergleich zu den Kontrollzellen. Es fand somit ein partieller postradiogener G₂/M-Arrest statt. Die Behandlung mit dem Kaliumkanalinhibitor TEA hatte hierauf keinen Einfluss, ebenso wenig auf die Fraktion abgestorbener Zellen, welche als subG₁-Population definiert wurde (Abb. 2).

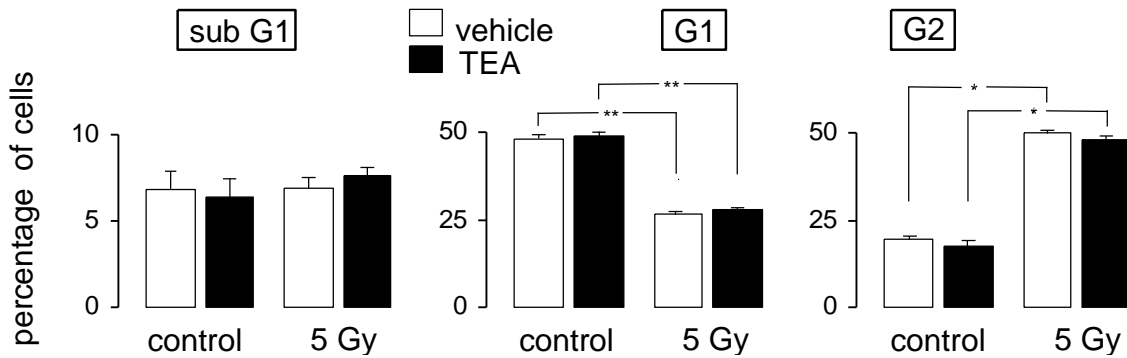


Abbildung 2. Ionisierende Strahlung induziert einen G₂/M Zellzyklusarrest 24 h nach Bestrahlung in HEK 293-Zellen. Gemittelte \pm SE ($n = 9$) prozentuale Anteile von abgestorbenen Zellen (SubG₁-Population, links), sowie von Zellen in der G₁ (Mitte) und G₂ (rechts) Phase des Zellzyklus. Die Zellen wurden entweder ohne (Vehikel, offene Balken) oder im Beisein (geschlossene Balken) des K⁺-Kanal-Inhibitors TEA (1 mM) bestrahlt (5 Gy) und 24 h nachinkubiert. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des DNA-spezifischen Farbstoffes Propidium-Iodid bestimmt (* und ** kennzeichnen $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$, parametrischer ANOVA). Eine einmalige Bestrahlung mit 5 Gy induzierte einen partiellen postradiogenen Zellzyklusarrest: nach 24 h befinden sich ungefähr doppelt so viele Zellen in der G₂-Phase im Vergleich zu den Kontrollzellen; die Behandlung mit dem Kaliumkanalinhibitor TEA beeinflusste den Zellzyklusarrest sowie die Fraktion abgestorbener Zellen nicht.

Nach 48 Stunden befanden sich wieder deutlich mehr der mit 5 Gy bestrahlten Zellen in der G₁-Phase. Somit konnte ein signifikanter Anteil der Zellen den Zellzyklusarrest nach 48 h wieder verlassen (Abb. 3). Die Zugabe von TEA als unspezifischen K_v-Kanalinhistor bewirkte, dass der Anteil der Zellen in der G₂-Phase ungefähr konstant blieb. Somit konnte durch die K_v-Kanal-Blockade das Wiedereintreten in den Zellzyklus verhindert werden. Bei den unbestrahlten Kontrollzellen zeigte sich jedoch kein Einfluss der K_v-Kanalinhibition auf den Zellzyklus. Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass eine postradiogene K_v-Kanalaktivierung einen essentiellen Faktor für das Überwinden des Zellzyklusarrestes nach Bestrahlung darstellt. Auf den Anteil an abgestorbenen Zellen hatte die Kaliumkanalinhibition auch nach 48 h keinen signifikanten Einfluss (Abb. 3).

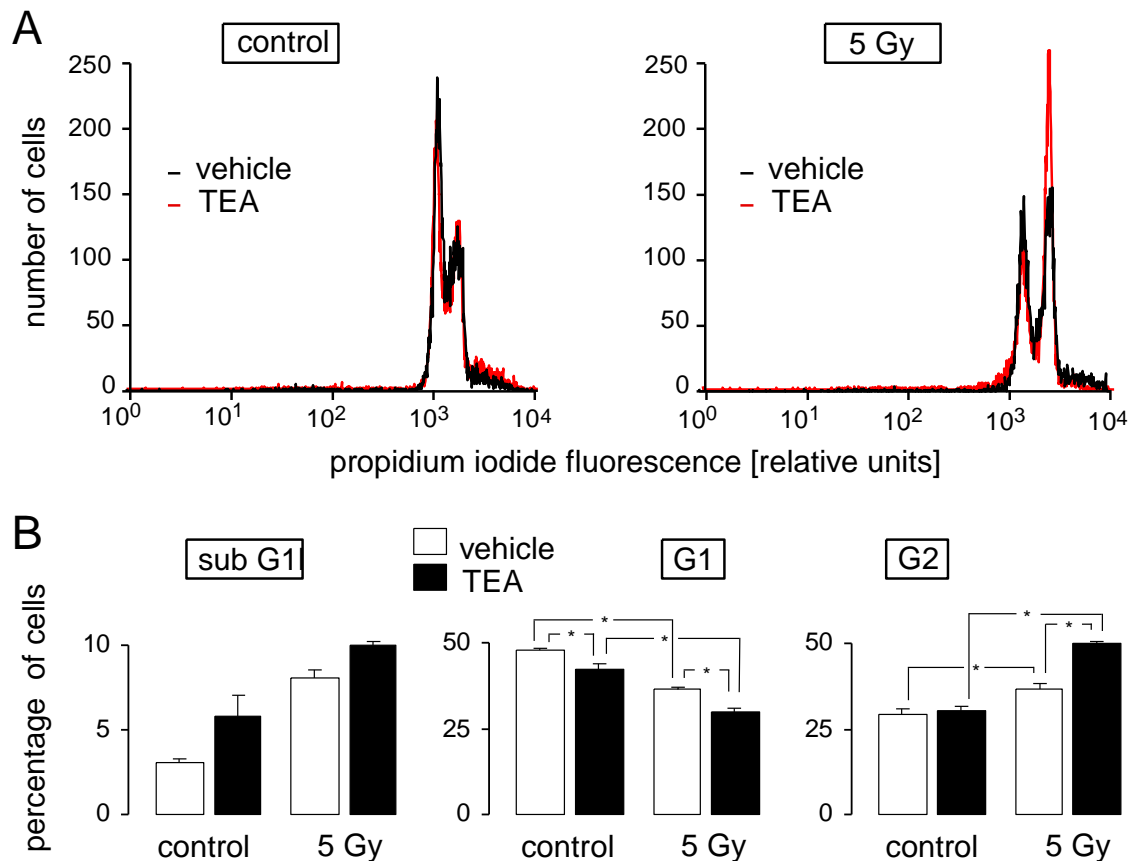


Abbildung 3. Der K^+ -Kanal-Inhibitor TEA verzögert den Wiedereintritt in den Zellzyklus von bestrahlten HEK 293-Zellen 48 h nach Bestrahlung. A. Die Durchflusszytometrie-Histogramme zeigen die DNA-spezifische Propidiumiodid-Fluoreszenzintensität von HEK 293-Zellen 48 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (Control, links) oder 5 Gy (rechts). Die Kulturen wurden entweder mit Vehikel (schwarz) oder TEA (5 mM, rot) bestrahlt und nachinkubiert. B. Gemittelte \pm SE ($n = 9$) prozentuale Anteile von abgestorbenen Zellen (SubG₁-Population, links), sowie von Zellen in der G₁ (Mitte) und G₂ (rechts) Phase des Zellzyklus. Die Zellen wurden wie in (A) entweder ohne (Vehikel, offene Balken) oder im Beisein (geschlossene Balken) des K^+ -Kanal-Inhibitors TEA (1 mM) bestrahlt (5 Gy) und 48 h nachinkubiert. (* kennzeichnet $p \leq 0,05$, parametrischer ANOVA).

Zellen, deren K^+ -Kanäle mit TEA gehemmt wurden, zeigen einen deutlich verlängerten G₂/M-Arrest 48 h nach einmaliger Bestrahlung mit 5 Gy als Vehikel-behandelte Zellen.

3.2 Upstream-Signaling

Die Zellzyklus-Experimente deuten auf eine Beteiligung von TEA-sensitiven K^+ -Kanälen bei der Zellzykluskontrolle bestrahlter HEK 293-Zellen hin. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist bekannt, dass eine ionisierende Bestrahlung zu einer Aktivierung von IGF-Rezeptoren führen kann. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in HEK 293-Zellen der proliferative Effekt einer IGFR-Stimulierung über eine nachfolgende Aktivierung der Serum- und Glucokortikoid-

induzierbaren Kinase-1 (SGK-1) und nachgeschaltet von TEA-sensitiven K_v-Kanälen vermittelt wird^{30,52,81}.

Mittels Western Blot-Analysen wollten wir daher bestätigen, dass dieser Signalweg auch dem von uns gezeigten Effekt der Bestrahlung auf den Zellzyklus zugrunde liegen könnte. Wir kultivierten HEK 293-Zellen für 12 Stunden in serumfreien Medium und stimulierten sie 5 Minuten vor der Bestrahlung mit entweder 0% oder 1 % FCS und bestrahlten die Zellen mit 0 Gy, 1 Gy oder 5 Gy (Abb. 4).

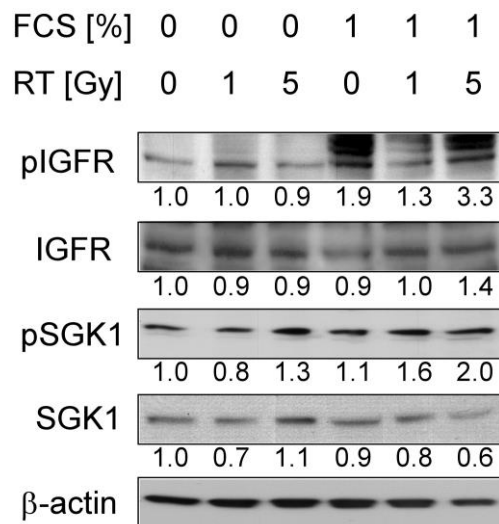


Abbildung 4 Radiogene Aktivierung des IGF-Rezeptors und der SGK1-Kinase. FCS-depletierte (12 h) Zellen wurden mit 0 % bzw. 1% FCS stimuliert (5 min vor Bestrahlung), mit 0 Gy, 1 Gy bzw. 5 Gy bestrahlt und 1 Stunde nach Bestrahlung lysiert. Die Ganzzelllysate wurden mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese nach Proteingröße aufgetrennt, geblottet und schließlich gegen IGFR, p-(Tyr1158/Tyr1162/Tyr1163)-IGFR, SGK1, p-(Ser255/Thr256)-SGK1 und zur Ladungskontrolle gegen β-Aktin immungefärbt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemolumineszenz und Filmautoradiographie detektiert und die Filmschwärzung densitometrisch semiquantifiziert. Die Zahlen unter den jeweiligen Banden geben die auf die erste Bande (0 % FCS, 0 Gy) bezogene, β-Aktin-normalisierte Proteinabundanz des jeweilige Proteins an.

Ionisierende Strahlung induziert in Kombination mit FCS-Stimulation die Aktivierung von IGF-Rezeptoren und der Kinase SGK1.

Als Positivkontrolle für die aktivierende Phosphorylierung des IGF-Rezeptors und der SGK-1 dienten die mit 1 % FCS stimulierten Zellen; die serumdepletierten Zellen stellten die Negativkontrolle dar. Bei den mit 1 % FCS stimulierten und 0 Gy bestrahlten Zellen zeigte sich eine doppelt so hohe

Abundanz des phosphorylierten (= aktivierten) IGF-Rezeptors. Bestrahlung mit 5 Gy induzierte in den FCS-stimulierten Zellen eine nochmals erhöhte IGFR-Phosphorylierung (Faktor 3,3 im Vergleich zu den serumdepletierten mit 0 Gy bestrahlten Zellen). Bei den serumdepletierten Zellen ließ sich dagegen durch eine Bestrahlung keine Erhöhung der pIGFR-Abundanz erzielen. Eine gleichsinnige Reaktion ist ebenfalls für die pSGK-1 zu erkennen. In serumdepletierten Zellen aktivierte die Bestrahlung mit 5 Gy die SGK-1 leicht, die Bestrahlung mit 1 Gy sowie mit 5 Gy führt in Anwesenheit von Serum zu einer verstärkten aktivierenden Phosphorylierung der SGK-1 auf das 1,6-fache bzw. das 2,0-fache des Ausgangswertes (Abb. 4).

3.3 Funktionelle Charakterisierung der strahlungsinduzierten Kaliumkanäle

In den durchflusszytometrischen Experimenten hatte sich ein Zusammenhang zwischen den Zellzyklusveränderungen nach Bestrahlung und einer Kaliumkanalinhibition mit TEA gezeigt. Um die Auswirkungen der Bestrahlung auf die K^+ -Kanalaktivität in der Zellmembran zu untersuchen, führten wir elektrophysiologische Patch clamp-Messungen im Ganzzellmodus durch. In (Abb. 5) ist eine exemplarische Stromableitung dargestellt.

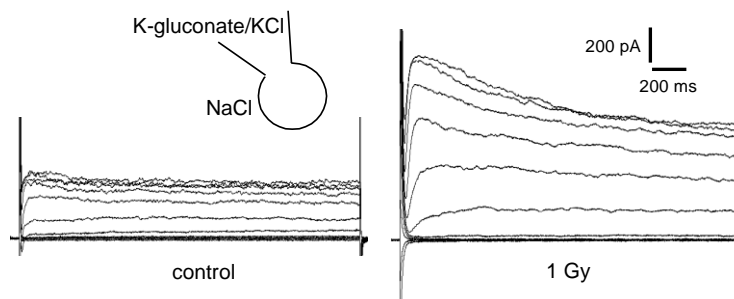


Abb. 5. Exemplarische Stromableitungen von bestrahlten HEK 293-Zellen. Original Ganzzellstrom-Spuren einer Kontroll- (links) und einer mit 1 Gy bestrahlten Zelle (rechts). Die Zellen wurden mit K-Gluconat/KCl in der Pipette und NaCl in der Badlösung im Ganzzellmodus 3 h nach Bestrahlung abgeleitet. Das Haltepotential wurde auf -70 mV geklemmt und nachfolgend auf -100 mV für 200 ms verringert und in jeweils +20 mV-Schritten bis auf +100 mV angehoben. Um eine Use-Dependent-Inactivation zu vermeiden (wie bei $K_v1.3$ beschrieben), wurde zwischen den einzelnen Spannungssprüngen jeweils für 20 Sekunden das Haltepotential von -70 mV wieder hergestellt. Die Stromkurven der jeweiligen Spannungssprünge sind in der Abbildung übereinandergelegt.

Die Bestrahlung mit 1 Gy aktiviert spannungsinduzierte inaktivierende K^+ -Auswärtsströme.

Hier zeigte sich eine Aktivierung von K^+ -selektiven Auswärtsströmen durch die Bestrahlung, da die Substituierung von Cl^- in der Badlösung durch Glukonat keinerlei Auswirkung auf die Ströme hatte (Daten nicht gezeigt). Die spannungsabhängige Aktivierung und nachfolgende Inaktivierung der K^+ -Auswärtsströme deutete auf die Beteiligung sogenannter voltage-gated (K_v) K^+ -Kanäle hin (Abb. 5 und 6).

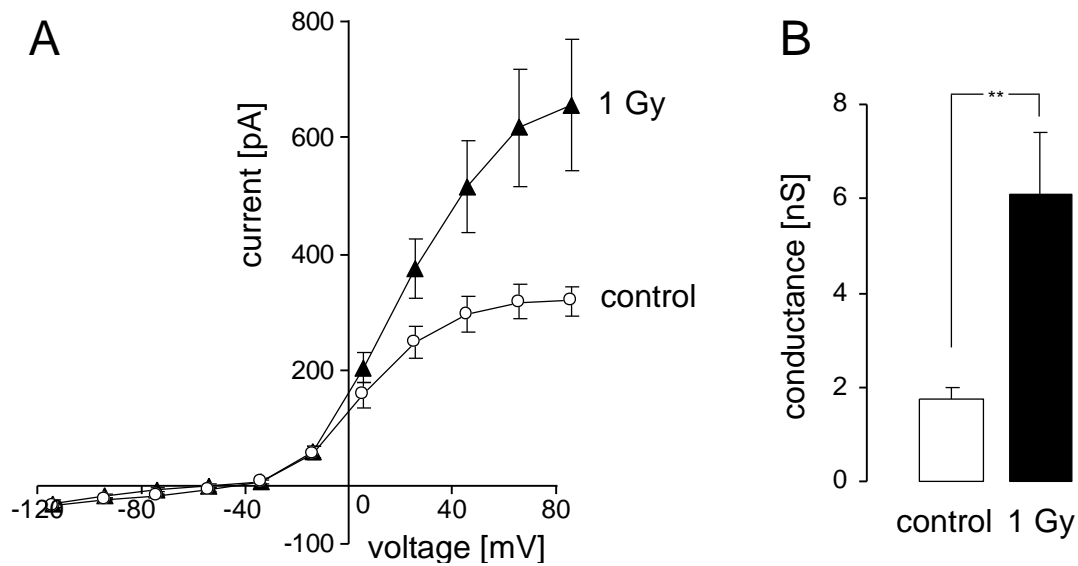


Abb. 6. Radiogene Aktivierung von K_v -Kanälen. **A.** Stromspannungskurven (Mittelwerte \pm SE, $n = 11-28$) von Kontrollzellen (Kreissymbole) und bestrahlten Zellen (Dreieckssymbole; 2.5–3.5 h nach Bestrahlung mit 1 Gy). Die angelegte Spannung bezieht sich auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran relativ zum Extrazellulärraum gesehen. Auswärtsströme definieren Flüsse von positiven Ladungen von intrazellulär nach extrazellulär und werden in den Stromspannungskurven als positive Ströme nach oben aufgetragen. **B.** Mittlere Leitfähigkeit (\pm SE, $n = 11-28$) von Kontroll- (offener Balken) und bestrahlten Zellen (1 Gy, geschlossener Balken). Die Leitfähigkeiten wurden aus den Daten in (A) durch lineare Regression der Stromwerte zwischen +25 und +65 mV Spannung errechnet (** kennzeichnet $p \leq 0,01$, Welch-korrigierter t-Test).

Eine Bestrahlung mit 1 Gy induziert eine Verdopplung der Aktivität von K_v K^+ -Kanälen in HEK 293 Zellen.

In Abb. 7 wird die zeitliche Abfolge der radiogenen K_v K^+ -Kanal-Aktivierung dargestellt. Die Aktivierung erfolgte ab der zweiten Stunde nach Bestrahlung und erreichte ein Maximum nach vier Stunden, um im weiteren Verlauf wieder auf unter das Ausgangsniveau abzunehmen.

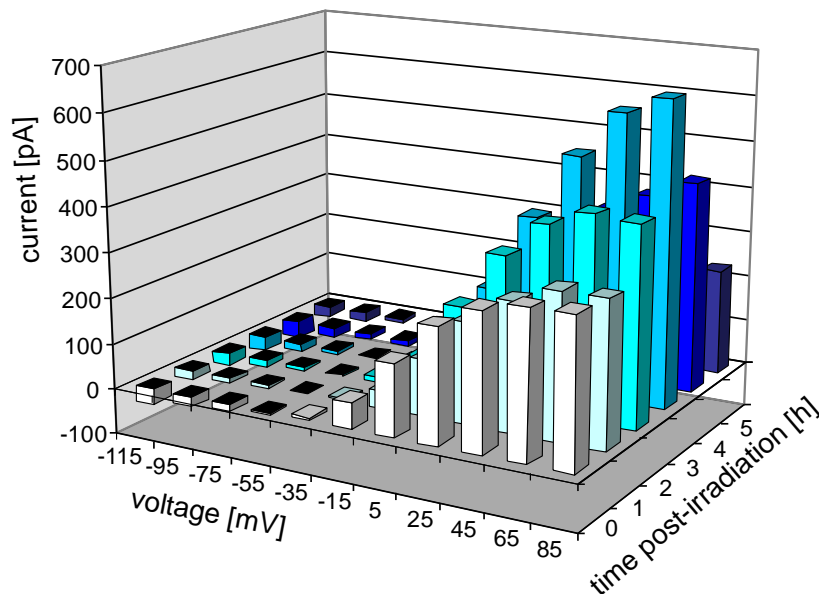


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Stromspannungskurven nach Bestrahlung mit 1 Gy ($n = 10-38$) Die Stromflüsse wurden gegen die Spannung und die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen (Ableitbedingungen wie in Abb. 5 und 6 beschrieben).

Die radiogene K_v K^+ -Kanalaktivierung erfolgt innerhalb von wenigen Stunden nach Bestrahlung.

Um eine eventuelle Abhängigkeit der K^+ -Kanalaktivierung von der applizierten Dosis der Bestrahlung zu untersuchen, führten wir zusätzliche Messungen nach einer einmaligen Bestrahlung mit 10 Gy durch. Die Aktivierung der Kanäle unterschied sich nicht signifikant zwischen einer einmaligen Bestrahlung mit 1 Gy und 10 Gy (Abb. 8).

Zur genaueren Spezifizierung der beteiligten K_v -Kanal-Subtypen führten wir Messungen mit Kaliumkanalinhibitoren durch. Die aktivierten Kanäle ließen sich mit verschiedenen Kaliumkanalblockern sehr gut inhibieren, wobei der relativ unspezifische Blocker TEA (Tetraethylammoniumchlorid) den größten Effekt mit einer dosisabhängigen Reduktion der Kaliumleitfähigkeit auf 21 % bei einer Konzentration von maximal 10 mM zeigte (Abb. 9 und 10).

Dieser Effekt war nach dem Auswaschen des TEA partiell reversibel (Abb. 9)

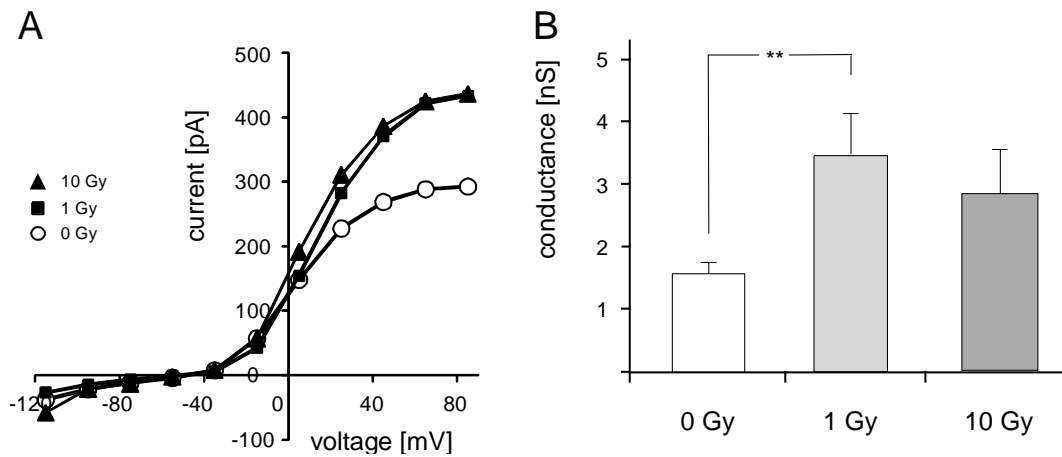


Abb. 8. Dosisabhängigkeit der radiogenen K_v -Kanalaktivierung in HEK 293-Zellen
A. Stromspannungskurven und **B.** berechnete Leitfähigkeiten (Mittelwerte \pm SE, $n = 10-33$) von mit 0 Gy (weiße Kreise, weißer Balken), 1 Gy (schwarze Kreise, hellgrauer Balken) sowie 10 Gy (schwarze Dreiecke, dunkelgrauer Balken) bestrahlten Zellen (2.5–3.5 h nach Bestrahlung; Ableitbedingungen und Berechnung der Leitfähigkeiten wie in Abb. 5 und 6 beschrieben; ** kennzeichnet $p \leq 0,01$, nicht-parametrischer ANOVA).

Eine Dosis von 10 Gy induziert keine höheren Ströme als eine Dosis von 1 Gy.

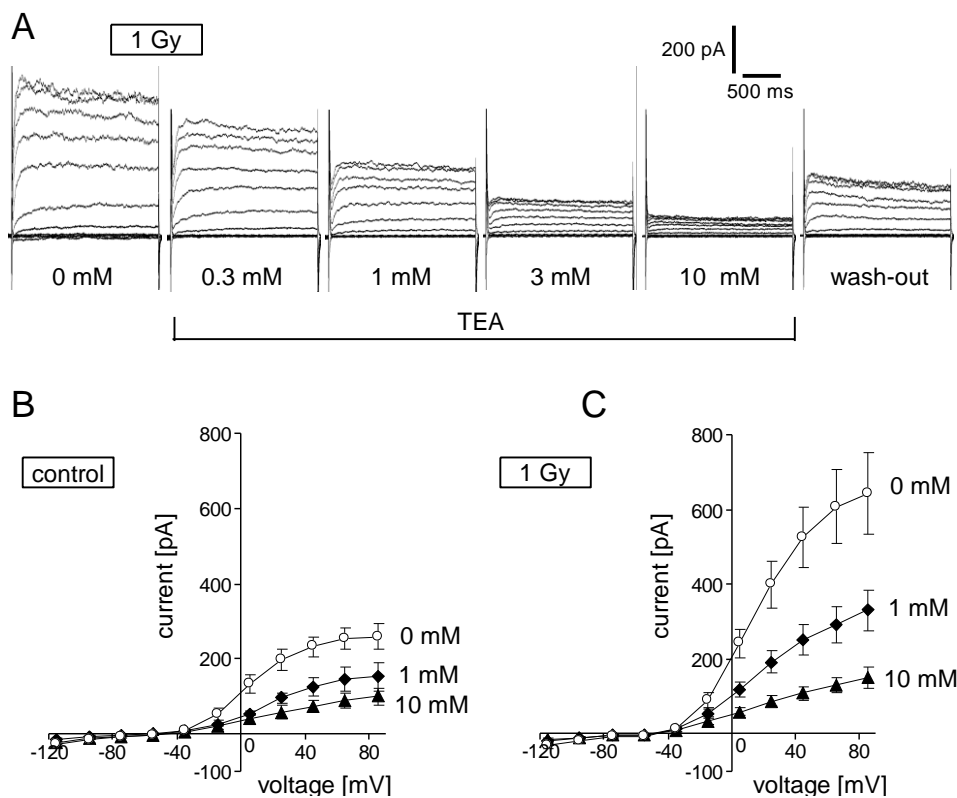


Abb. 9. TEA inhibiert die radiogen aktivierten K_v , K^+ -Kanäle in HEK 293-Zellen.
A. Originalstromspuren einer bestrahlten (1 Gy) Zelle vor (0 mM), während der Bad-Applikation von ansteigenden Konzentrationen von TEA (0,3 - 10 mM) sowie nach dem Auswaschen von TEA aus der Badlösung (Ableitbedingungen wie in Abb. 5 und 6 beschrieben). **B.** **C.** Stromspannungskurven (Mittelwerte \pm SE, $n = 3-11$) von Kontroll- (**B**) und mit 1 Gy bestrahlten Zellen (**C**) abgeleitet in Abwesenheit (0 mM, weiße Kreise) oder Anwesenheit von 1 mM (schwarze Rauten) oder 10 mM TEA (schwarze Dreiecke).

Der radiogene K_v - K^+ -Strom kann durch TEA mit einer IC₅₀ im Bereich von 1 mM gehemmt werden.

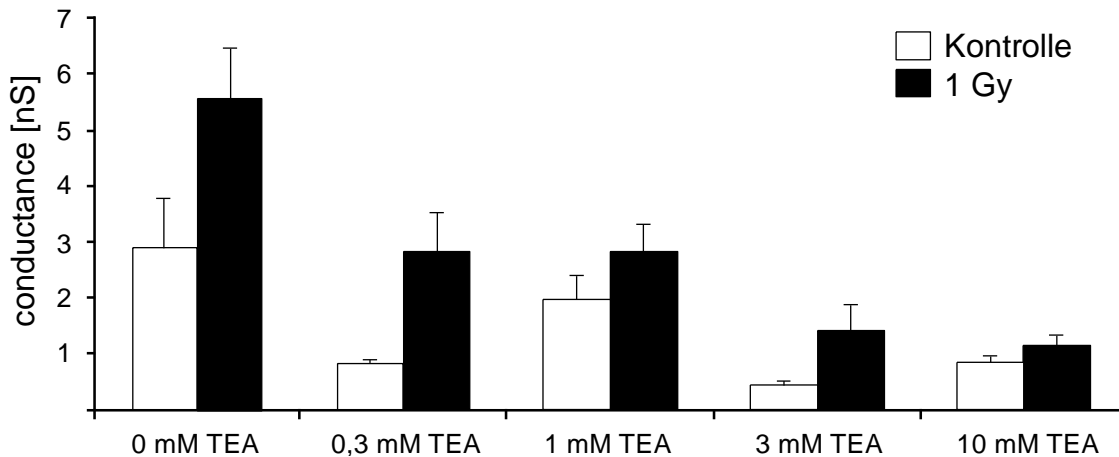


Abb. 10. Dosisabhängige Inhibition der K^+ -Leitfähigkeit von HEK 293-Zellen durch TEA. Leitfähigkeiten (Mittelwerte \pm SE, $n = 3-11$) von mit 0 Gy (offene Balken) und mit 1 Gy (geschlossene Balken) bestrahlten Zellen (2.5–3.5 h nach Bestrahlung) abgeleitet vor (0 mM) und während Bad-Applikation von ansteigenden Konzentrationen von TEA. Die Berechnung der Leitfähigkeiten aus den in Abb. 9 gezeigten Daten erfolgt wie in Abb. 6 beschrieben.

Andere, für einzelne Subtypen der K_v -Kanäle deutlich spezifischere Blocker wie beispielsweise Margatoxin ($K_v1.1-1.3$) oder Agitoxin ($K_v1.3$), zeigten keine bzw. lediglich eine partielle Blockade der Kaliumleitfähigkeit, was darauf schließen lässt, dass $K_v1.1-3$ -Kanäle nur für einen sehr kleinen Anteil der gemessenen Ströme verantwortlich waren (Abb. 11).

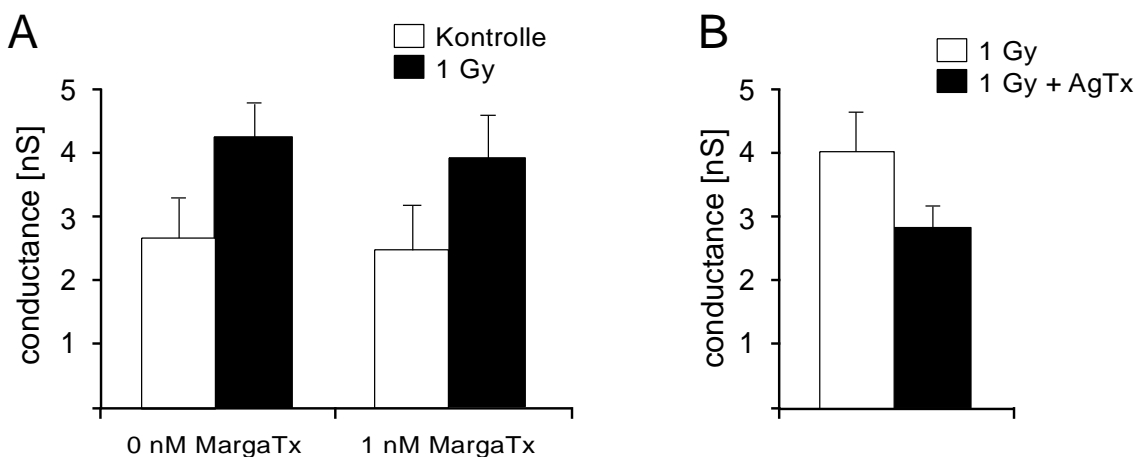


Abb. 11. Die für K_v 1.1-1.3 spezifischen Inhibitoren Margatoxin und Agitoxin haben kaum einen Effekt auf die radiogen aktivierten K_v -Kanäle in HEK 293-Zellen. A-B. Mittlere Leitfähigkeiten (\pm SE, $n = 5-15$) von mit 0 Gy (A, links) und 1 Gy (A, rechts und B) bestrahlten Zellen. Die Ableitungen wurden wie in Abb. 5 und 6 beschrieben in Abwesenheit (offene Balken) oder Anwesenheit von Margatoxin (MargaTx, 1 nM, A, geschlossene Balken) bzw. Agitoxin (AgTx, 1 nM, B, schwarzer Balken) durchgeführt und die Leitfähigkeit wie in Abb. 6 beschrieben berechnet.

K_v 1.1-1.3 sind nicht oder nur unwesentlich an der radiogenen K_v K^+ -Leitfähigkeit in HEK 293-Zellen beteiligt.

3.4 Downstream-Signaling der radiogenen K_v K^+ -Kanäle

Wie in der Einleitung erwähnt, besteht unter anderem über die Regulation des Membranpotentials ein enger Zusammenhang zwischen der Aktivität von K_v -Kanälen und dem Kalziumsignaling der Zellen⁷³. Über Kalziumsignale wiederum werden wichtige Übergänge im Zellzyklus reguliert^{5,8}. Um den Zusammenhang zwischen der postradiogen erhöhten Kaliumkanalaktivität und den Zellzyklusveränderungen nach Bestrahlung näher zu verstehen, führten wir fluoreszenzmikroskopische Experimente zur Quantifizierung der freien zytosolischen Kalziumkonzentration mittels FURA-2-Kalziumimaging durch. Kalzium bindet intrazellulär an FURA-2. FURA-2 verändert je nach Bindungszustand von Kalzium sein Anregungsmaximum von 380 nm (nicht an Kalzium gebunden) nach 340 nm (an Kalzium gebunden). Durch das Errechnen des Quotienten 340/380 nm kann man nun auf die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration schließen. Dieses Ratio ist nur von der intrazellulären Kalziumkonzentration, nicht aber von der FURA-2-Konzentration abhängig.

Das verwendete Mess-Protokoll beinhaltete drei Phasen: 1. Bestimmung des 340/380 nm Ratios in kalziumhaltiger Badlösung 2. extrazelluläre Kalziumdepletion und zuletzt 3. Kalzium-Wiederzugabe.

Es zeigen sich typische Veränderungen der bei 510 nm gemessenen Fluoreszenz-Emission: In der ersten Phase bei Superfusion kalziumhaltiger Lösung (Abb. 12 A) stellte sich ein stabiler Ruhemesswert ein (Steady State). Nun erfolgte die extrazelluläre Kalziumdepletion. Die Zellen verloren sukzessive das intrazelluläre Kalzium, sodass das 340/380 nm Ratio deutlich absank (Abb. 12 B). Nach der erneuten Zugabe von Kalzium kam es zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle, welcher sich in einem Anstieg des 340/380 nm Ratio widerspiegelte (Abb. 12 C). Die Steigung des 340/380 nm Ratio-Anstiegs war hierbei ein Maß für den Kalziumeinstrom in die Zelle.

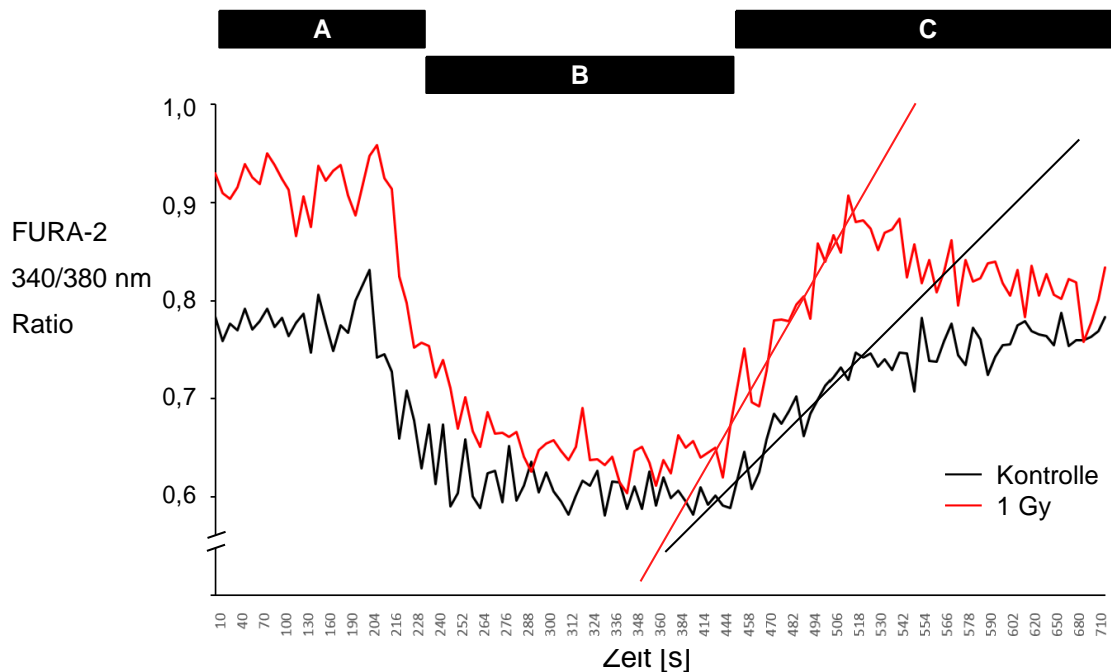


Abb. 12. Zeitabhängige Veränderung der freien zytosolischen Kalziumkonzentration durch extrazelluläre Kalziumdepletion und nach Kalziumzugabe in HEK 293-Zellen Fabgeleitet in einer Kontroll- (schwarz) und einer bestrahlten (1 Gy, 120 min nach Bestrahlung, rot) Zelle vor (A) und während (B) extrazellulärer Kalzium-Wegnahme sowie nach Kalzium-Wiederzugabe (C). Exemplarisch wird je eine Zelle gezeigt. Die Striche kennzeichnen die Berechnung des Ratio-Anstiegs nach Kalziumwiederzugabe als Maß für den Kalziumeinstrom in die beiden Zellen.

Die Plasmamembran von HEK 293-Zellen exprimiert somit eine konstitutiv-aktive Kalziumleitfähigkeit.

Die Messung der Steilheit des Anstiegs des intrazellulären Kalziumgehalts nach Kalziumdepletion und Wiederzugabe von Kalzium entspricht der Aktivität und Offenwahrscheinlichkeit von Kalziumkanälen (bspw. speicherregulierter oder spannungsabhängiger Kalziumkanäle). Eine exemplarische Kurve des Quotienten und damit des freien intrazellulären Kalziumgehaltes nach Kalziumdepletion und Kalziumreaddition ist in Abb. 12 dargestellt. Es wurde sodann dessen Änderung durch die Bestrahlung sowie die Auswirkungen der Inhibition von spannungsaktivierten Kaliumkanälen gemessen.

3.4.1 Veränderung des Kalziumeinstroms durch Bestrahlung

Bei den mit 1 Gy bestrahlten kalziumdepletierten Zellen zeigte sich eine um etwa den Faktor 2 höherer Kalziumeinstrom nach Kalziumwiederzugabe. Der Unterschied zu den Kontrollen war hoch signifikant (Abb. 13). Da

speicherregulierte Kalziumkanäle (I_{CRAC}) ein negatives Membranpotenzial benötigen^{66,87}, könnte die von uns beobachtete radiogene $K_v K^+$ Kanal-Aktivierung zu diesem radiogenen Kalziumeinstrom beitragen. Um dies zu testen, wurde der radiogene Kalziumeinstrom in Ab- und Anwesenheit des $K_v K^+$ -Kanalinhibitors TEA bestimmt. Unerwarteterweise konnte durch die Zugabe von TEA in die kalziumfreie Lösung 2 eine um den Faktor 3 höhere Steigung des Quotienten im Vergleich zu den Kontrollen sowie um fast den Faktor 2 im Vergleich zu den mit 1 Gy bestrahlten Zellen ohne TEA-Zugabe bewirkt werden (Abb. 13).

Dieser Befund spricht somit gegen die oben erwähnte Hypothese. Durch die Zugabe von TEA in die kalziumfreie Lösung 2 zeigte sich bei den nicht bestrahlten Zellen keine signifikante Änderung des Ratio-Anstiegs nach Kalziumwiederzugabe (Abb. 13), was wiederum auf einen durch die radiogene Kaliumkanalaktivierung bedingten Effekt schließen lässt.

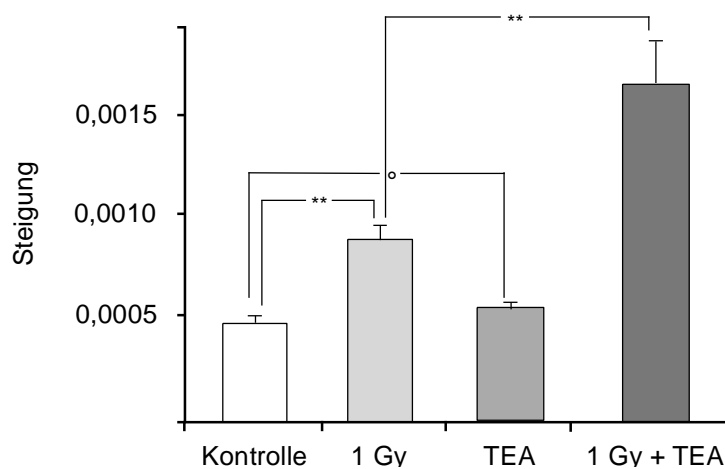


Abb. 13. Auswirkung von TEA auf den Kalziumeinstrom in HEK 293-Zellen nach Kalzium-Depletion Mittlerer (\pm SE, $n = 51-154$) FURA-2 340/380 nm Ratio-Anstieg nach Kalziumwiederzugabe zu Kalzium-depletierten und mit 0 Gy (Kontrolle, TEA) bzw. 1 Gy bestrahlten (1 Gy, 1 Gy + TEA) Zellen. Der Anstieg wurde in Abwesenheit (Kontrolle, 1 Gy) und Anwesenheit der Vorinkubation mit dem $K_v K^+$ -Kanalinhibitor TEA (1 mM; TEA, 1 Gy + TEA) bestimmt. ** kennzeichnet $p \leq 0,01$, nicht-parametrischer ANOVA).

Die $K_v K^+$ -Kanal-Inhibition erhöht den radiogenen Kalziumeinstrom.

3.4.2 Zeitlicher Verlauf der radiogenen Induktion des Kalziumeinstroms

Der zeitliche Verlauf der radiogenen Induktion des Kalziumeinstroms ähnelte dem der K_v K^+ -Kanäle (Abb. 14): in der ersten Stunde nach Bestrahlung zeigte sich kein verstärkter Anstieg des FURA-2 340/380 nm Ratios nach Kalziumwiederzugabe, es kam im Gegenteil zu einem leichten Abfall. In der zweiten Stunde nach Bestrahlung erhöhte sich der Ratio-Anstieg jedoch deutlich, um in der dritten Stunde nach Bestrahlung ein Maximum des 2,5fachen des Ausgangswertes zu erreichen und in der vierten Stunde wieder auf ein ähnliches Niveau wie vor der Bestrahlung abzusinken (Abb. 14). Dieser Verlauf deutet somit auf einen Zusammenhang des erhöhten Kalziumeinstroms nach Bestrahlung mit der zeitlich kohärenten Aktivierung spannungsabhängiger K^+ -Kanäle.

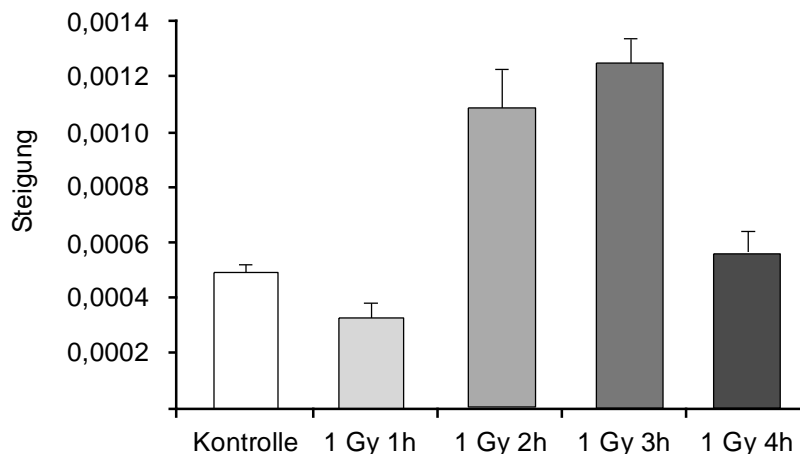


Abb. 14. Induktion des radiogenen Kalziumeinstroms im Zeitverlauf in HEK 293-Zellen Mittlerer (\pm SE, $n = 14-36$) FURA-2 340/380 nm Ratio-Anstieg nach Kalziumwiederzugabe zu Kalzium-depletierten und mit 0 Gy (Kontrolle, TEA) bzw. 1 Gy bestrahlten (1 Gy, 1 Gy + TEA) Zellen. Der Anstieg wurde 1-4 h nach Bestrahlung bestimmt.

Der Zeitverlauf der radiogenen Induktion des Kalziumeinstroms ähnelt dem der K_v K^+ -Kanäle.

4 Diskussion

Zellen gehen nach Bestrahlung einen temporären Zellzyklusarrest ein. Dieser kommt durch die Aktivierung des sogenannten DNA Damage Response (DDR) durch direkte und indirekte radiogene DNA-Schäden zustande und dient dazu, die durch die Bestrahlung entstandenen DNA-Schäden - sofern möglich - zu reparieren²⁵. Falls dies nicht möglich ist, wird die Zelle über durch den DDR aktivierte Signalwege in die terminale Seneszenz oder Apoptose geführt oder es kommt nach weiteren Mitosen letztendlich zur mitotischen Katastrophe mit daraus resultierendem Absterben der Zelle^{23,24,26,27}. In unseren FACS-Experimenten zeigte sich, dass sich die Zellen 24 Stunden nach Bestrahlung wie erwartet im partiellen Zellzyklusarrest befanden. Nach 48 Stunden befand sich ein Teil der bestrahlten Zellen wieder in der G₁-Phase, was bedeutet, dass sie im Zellzyklus wieder fortgeschritten sind. Durch eine Behandlung mit dem Kaliumkanalinhibitor TEA konnten die Zellen jedoch den postradiogenen Zellzyklusarrest zu diesem Zeitpunkt nicht überwinden und befanden sich noch zu einem signifikant höheren Anteil in der G₂-Phase. Auf den Zellzyklus der unbestrahlten Kontrollzellen hatte die Kaliumkanalinhibition keinen Einfluss. Hieraus kann man ableiten, dass dieser Effekt abhängig von der K_v-Kanalaktivität ist.

In den elektrophysiologischen Patch clamp-Experimenten konnten wir zeigen, dass es nach Bestrahlung zu einer erhöhten Aktivität von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in der Zellmembran kommt. HEK 293-Zellen exprimieren konstitutiv die Kaliumkanalproteine K_v1.1-4, K_v3.1 und K_v3.4⁵². Die gemessenen Strom-Spannungskurven entsprechen K_v-Kanalaktivitäten und konnten zudem durch K_v-Kanalinhhibitoren wie TEA, Margatoxin und Agitoxin in millimolaren bzw. nanomolaren Konzentrationen reversibel inhibiert werden. In früheren Experimenten konnte ebenfalls in HEK 293-Zellen durch eine Stimulierung mit IGF-1 eine ähnliche Erhöhung der K_v-Kanalaktivität wie durch die Bestrahlung mit 1-10 Gy erreicht werden⁵². Hier zeigte sich nach Stimulierung mit IGF-1 ein Anstieg der Kaliumkanalaktivität mit einem Maximum

nach 4-5 Stunden. Sowohl durch die Inhibition der PI₃-Kinase als auch durch eine Behandlung mit Kaliumkanalinhibitoren konnte interessanterweise der proliferative Effekt von IGF-1 auf HEK 293-Zellen gehemmt werden. Zum einen lässt sich hierdurch ableiten, dass die Aktivierung der K_v-Kanäle durch IGF-1 von der Aktivierung der PI₃-Kinase abhängt. Zum anderen konnte somit gezeigt werden, dass der proliferationsfördernde Effekt der spezifischen IGF-Rezeptor-Aktivierung durch IGF-1 zumindest teilweise über K_v-Kanäle vermittelt ist⁵².

In unseren Experimenten zeichnete sich eine ähnliche zeitliche Komponente wie nach extrazellulärer Stimulierung mit IGF-1 ab. So kam es ab der zweiten Stunde nach Bestrahlung zu einer erhöhten Kaliumkanalleitfähigkeit, die ihr Maximum nach 3 Stunden erreichte und danach wieder auf Normalwerte abfiel. Es ist bekannt, dass Rezeptortyrosinkinasen wie der IGF- und der EGF-Rezeptor unter anderem auch durch Bestrahlung aktiviert werden können^{30,34}. Ein möglicher Signalweg, der zur erhöhten Aktivierung der K_v-Kanäle nach Bestrahlung führen kann, ist also die radiogene Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen sowie nachfolgend die PI₃-Kinase vermittelte Aktivierung der PDK-1, der SGK-1 und der hiernach beschriebene verminderte Abbau der Kaliumkanalproteine in der Zellmembran^{54,97} und die aktivierende Modulation der Kanalaktivität^{51,59}. Sowohl über die radiogene Aktivierung des IGF-Rezeptors und nachfolgend den PI₃K-MAP-Kinasen-Signalweg^{30,43} als auch über die Aktivierung des EGF-Rezeptors kommt es zu einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen nach Bestrahlung. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors scheint durch eine verbesserte DNA-Reparatur, die Inhibition der Apoptose sowie eine gesteigerte Proliferationsrate nach Überwinden des Zellzyklusarrestes das Überleben der Zellen nach Bestrahlung zu erhöhen^{24,34}. In unseren Experimenten war die Aktivierung von K_v-Kanälen nach Bestrahlung notwendig für ein Fortschreiten im Zellzyklus nach initialem postradiogenen Zellzyklusarrest. Somit ist dieser proliferative Effekt der genannten Signalwege zumindest teilweise durch die postradiogen erhöhte K_v-Kanalaktivität vermittelt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Proliferationsrate einer Vielzahl von Zelllinien von spannungsaktivierten Kaliumkanälen abhängig⁷⁸. Dies kommt zum einen über die Regulation der grundlegenden Voraussetzungen für den

reibungslosen Ablauf der verschiedenen Phasen des Zellzyklus zustande, wie beispielsweise der genauen Regulation des Zellvolumens^{19,20,66} und der intrazellulären Osmolarität^{8,21}, der zyklischen Veränderungen des Membranpotentials¹⁸, des intrazellulären pH-Werts²² und des Kalziumhaushaltes^{8,65}. Die Inhibition von Kaliumkanälen führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials und wirkt somit der für den Eintritt in die G₁-Phase notwendigen transienten Hyperpolarisation entgegen⁵. Wie bereits erwähnt, konnte bereits sehr früh ein allgemeiner Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und der Proliferationsrate von Zellen hergestellt werden^{77,79,80}. Je höher die Proliferationsrate einer Zellpopulation, desto depolarisierter ist im Schnitt ihr Membranpotential im Vergleich zu ausdifferenzierten ruhenden Zellen⁵. Daher könnte in HEK 293-Zellen als immortalisierte Zellreihe mit einer relativ hohen Proliferationsrate eine höhere Abhängigkeit von der Kaliumkanalaktivität im Vergleich zu ruhenden Zellen bestehen, um transiente Hyperpolarisationen, die für bestimmte Schritte im Zellzyklus notwendig sind, zu erreichen⁷⁷.

Für den reibungslosen Ablauf der DNA-Reparatur nach Bestrahlung brauchen die Zellen zudem hohe Mengen an Glukose, um die DNA-Dekondensation und die Acetyl-CoA-Synthese für die Histonacetylierung zu gewährleisten. In A 549-Zellen konnte gezeigt werden, dass es nach Bestrahlung zu einer deutlich erhöhten Aktivität von SGLT (Sodium Glucose Cotransporter) kommt, die eine an Natrium gekoppelte Glukoseaufnahme vermitteln. Um den elektrochemischen Gradienten für den Natriumeinstrom aufrechtzuerhalten, ist eine Hyperpolarisation der Zellmembran über die postradiogene Kaliumkanalaktivierung notwendig⁸².

In Leukämiezellen^{10,98}, in Adenokarzinomzellen der Lunge^{82,99,100} und in Glioblastomzellen konnte bereits eine ähnliche Kaliumkanalaktivierung durch Bestrahlung gezeigt werden. Konträr zu unseren Messergebnissen konnte jedoch sowohl in K 562-Zellen als auch in Glioblastomzellen durch die pharmakologische Inhibition von K_v3.4-Kanälen bzw. von IK-Kanälen der postradiogene Zellzyklusarrest überwunden werden^{9,10}. Wie bereits erwähnt, ist für den Übergang G₂/M-Phase eine vorübergehende Depolarisation des

Membranpotentials notwendig^{18,75–77}. Über die Inhibition der gesteigerten K_v -Kanalaktivität durch TEA und der konsekutiven Depolarisation des Membranpotentials könnte somit der Übergang von der G_2 zur M-Phase erleichtert werden. Dieser Zellzyklusprogress trat trotz noch vorhandener residueller DNA-Schäden ein^{9,10}. Durch die Hemmung der IK-Kanäle in Glioblastomzellen kam es zu einer verzögerten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen⁹. Wenn die Zelle im Zellzyklus mit nicht reparierten DNA-Schäden fortschreitet, ist davon auszugehen, dass es in den folgenden Mitosen zur sogenannten mitotischen Katastrophe kommt. Somit führte die pharmakologische Inhibition der Kaliumkanäle konsekutiv zu einem radiosensibilisierenden Effekt, da diese Zellen nach einigen Mitosen starben und sich dadurch der Anteil der klonogenen Tumorzellen verminderte. Im Gegensatz zu den von uns verwendeten HEK 293-Zellen als immortalisierte humane Zellreihe sind jedoch sowohl K 562-Zellen als auch Glioblastomzellen entartete Zellen und somit in der Tumorgenese deutlich weiter fortgeschritten. Eine der charakteristischen Eigenschaften, die Zellen im Rahmen der schrittweisen Tumorgenese erwerben, ist das Umgehen von proliferationshemmenden internen und externen Signalen. In normalen Zellen kann erst im Zellzyklus fortgeschritten werden, wenn Schäden am Genom vollständig repariert sind und zudem die externen Bedingungen, wie die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung oder auch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, optimal sind^{2,3}. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die scheinbar gegensätzlichen Reaktionen der Zellen auf die Kaliumkanalinhibition nach Bestrahlung sein.

Eine weitere Erklärung ist der Zusammenhang der Kaliumkanalaktivität und des Kalziumhaushalts bzw. des Kalziumsignalings. Die Aktivität von K_v -Kanälen in der Zellmembran bestimmt zum größten Teil das Membranpotential der Zellen⁸. Wie bereits aufgeführt, hat die Aktivierung von K_v -Kanälen und die konsekutive Veränderung des Membranpotentials große Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt der Zellen, welcher wiederum einer der Schlüsselfaktoren für die Regulation des Zellzyklus darstellt^{5,8,73}. In unseren fluoreszenzmikroskopischen Experimenten konnte nach Bestrahlung nach

extrazellulärer Kalziumdepletion und Readdition eine signifikant höhere Kalziumwiederaufnahme als unter Kontrollbedingungen nachgewiesen werden. Hier zeigt sich wiederum ein paralleler zeitlicher Verlauf zur postradiogenen Kaliumkanalaktivierung mit einem Maximum der Kalziumwiederaufnahme 3-4 Stunden nach Bestrahlung und einem nachfolgenden Abfall auf Normalwerte. Bei HEK 293-Zellen konnte über eine Stimulierung mit IGF-1 über die Aktivierung von K_v -Kanälen eine Erhöhung des speicherregulierten Kalziumeinstroms (Capacitative Ca^{2+} Entry, CCE) nachgewiesen werden⁸¹. Dieser Effekt konnte durch eine Hemmung der K_v -Kanäle ausgelöscht werden, da hierdurch die für die Aktivierung des I_{CRAC} notwendige Hyperpolarisation des Membranpotentials nicht zustande kommen kann^{81,90,91}. Zudem konnte in K 562-Zellen gezeigt werden, dass die erhöhte Aktivierung von $K_v3.4$ -Kanälen für die postradiogen erhöhte Kalziumaufnahme notwendig ist¹⁰. Unter der Annahme, dass die erhöhte Kalziumwiederaufnahme nach extrazellulärer Kalziumdepletion und -readdition vor allem über den durch die Entleerung der Kalziumspeicherorganellen vermittelten Kalziumeinstrom (Ca^{2+} Release-activated Current, I_{CRAC}) zustande kommt (Store Operated Calcium Entry, SOCE), führten wir Calciumimaging-Messungen mit dem Kaliumkanalinhibitor TEA durch. Für den I_{CRAC} ist die Hyperpolarisation des Membranpotentials durch die Aktivierung von Kaliumkanälen essentiell⁹¹. Entsprechend erwarteten wir durch Hemmung der Kaliumkanäle und die konsekutive Depolarisation der Zellmembran eine Hemmung der Kalziumwiederaufnahme nach extrazellulärer Kalziumdepletion und -readdition. Unerwarteterweise konnte durch eine Kaliumkanalinhibition mit TEA eine deutliche Steigerung der Kalziumaufnahme nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Auf die Kalziumaufnahme der Kontrollzellen hatte die Kaliumkanalinhibition jedoch keinen Einfluss. Hieraus lässt sich ableiten, dass dieser Effekt durch die spezifisch veränderte Kaliumkanalaktivität nach Bestrahlung zustande kommt. Der durch die Kaliumkanalinhibition erhöhte Kalziumeinstrom nach Bestrahlung könnte durch Kalziumkanäle, die auf Depolarisationsreize öffnen, vermittelt sein. Hier kommen beispielsweise L-Typ-Kalziumkanäle oder auch nicht-selektive

TRPM 8-Kalziumkanäle in Frage^{9,67,101}. Diesbezüglich sind weitere Experimente zur genaueren Identifikation der beteiligten Kanäle notwendig.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, hängt der Zellzyklus eng mit dem Kalziumhaushalt und der zeitlichen und örtlichen Komponente sowie der Frequenz und Amplitude von Kalziumoszillationen zusammen¹⁷. Die Membranpotentialänderungen, die durch eine modulierte Kaliumkanalaktivität und -expression zustande kommen, haben direkte Auswirkungen auf intrazelluläre Kalziumsignale, indem sie zum einen den Aktivitätszustand von spannungsabhängigen Kalziumkanälen beeinflussen und zum anderen den elektrochemischen Gradienten sowohl für die Kalziumeinstrom in die Zelle als auch den Kalziumtransport aus der Zelle heraus bestimmen¹⁰. In bestrahlten K 562-Zellen konnte eine Aktivierung von $K_v3.4$ -Kanälen mit einer konsekutiven Hyperpolarisierung der Zellmembran sowie einem erhöhten Kalziumeinstrom am ehesten über TRPV 5/6-Kanäle gezeigt werden. Hierdurch kam es zu einer Aktivierung der CAMK II und der konsekutiven Inaktivierung von Cdc25B und des Mitosis Promoting Factors (MPF). Durch eine postradiogene Inhibierung der K_v -Kanalaktivierung kam es zu einem Fortschreiten im Zellzyklus, welcher mit einer erhöhten Apoptoserate sowie verminderter Klonogenität verbunden war¹⁰. In unseren Experimenten konnten die Zellen im Gegensatz zu den K 562-Zellen durch die Kaliumkanalinhibition im Zellzyklus nicht fortschreiten. Eine mögliche Erklärung liegt auch hier im Grad der Entdifferenzierung der Zellen. Sowohl durch eine Absenkung der extrazellulären Kalziumkonzentration unter einen bestimmten Schwellenwert als auch durch eine Blockade von Kalziumkanälen kommt es zu einer Akkumulation von Zellen in der G_1 -Phase⁸⁵. So konnte bereits in den 70er Jahren durch einfache Experimente gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang des Transformierungsgrades der Zellen und der Abhängigkeit des Zellzyklus von der extrazellulären Kalziumkonzentration besteht. Je höher der Grad an Transformation und Entdifferenzierung der Zellen, desto geringer ist die Abhängigkeit vom extrazellulären Kalziumspiegel. So können entdifferenzierte Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen auch bei extrem niedrigen extrazellulären Kalziumspiegeln im Zellzyklus voranschreiten^{85,86}. Es liegt somit nahe, dass die

lediglich immortalisierten HEK 293-Zellen durch die K_v-Kanalinhibierung und dem konsekutiv gestörten Kalziumhaushalt im Gegensatz zu den Leukämiezellen den postradiogenen Zellzyklusstopp nicht überwinden können, da sie abhängiger von einem ungestörten Kalziumsignaling und Kalziumhaushalt sind ¹⁰². Offensichtlich sind HEK 293-Zellen nach der Bestrahlung auf das ungestörte Zusammenspiel von einer erhöhten Kaliumkanalaktivität sowie einer in einem gewissen Maß erhöhten Kalziumaufnahmefähigkeit angewiesen, um sich von den durch die Bestrahlung induzierten Schäden zu erholen.

Im Zusammenhang des Zellzyklus und des Kalziumhaushaltes spielen extrem komplexe Mechanismen und Signalwege eine Rolle ^{17,65,88}. Grundlegend kann man festhalten, dass die Zellzyklusprogression zu einem gewissen Maß vom extrazellulären Kalziumspiegel abhängt, jedoch zu hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen für die Zelle ebenfalls toxisch sind und in die Apoptose führen ⁸⁸. Zwischen diesen beiden Extremen bewegen sich die endogenen Kalziumsignale, welche über ein kompliziertes Zusammenspiel von Aktivierung und Deaktivierung von Kalium- und Kalziumkanälen zu örtlich, zeitlich und frequenzverschlüsselten Kalziumoszillationen in verschiedenen zellulären Kompartimenten führen, die die Reaktionen der Zelle auf externe Reize und Stressfaktoren wie beispielsweise eine ionisierende Bestrahlung beeinflussen.

Eine Kaliumkanalmodulation, die zu einem Radiosensitizing von Tumorzellen führen könnte, wie bei K 562-Zellen ¹⁰ und Glioblastomzellen ⁹ in vitro bereits beschrieben, wäre bei gleichzeitiger Schonung oder sogar Radioprotektion des Normalgewebes ein interessanter Therapieansatz. Ein bislang limitierender Faktor der therapeutischen pharmakologischen Kaliumkanalmodulation ist die Kaliumkanalexpression im Normalgewebe und hier vor allem im Herzmuskelgewebe und im zentralen Nervensystem. Allerdings werden bereits seit Jahren im Bereich der Neurologie, der Dermatologie sowie der Kardiologie Medikamente eingesetzt, die die Kaliumkanalfunktion beeinflussen. Bislang waren hierbei die Komplikationen im Sinne von kardiologischen (vor allem Long-QT-Syndrom und Arrhythmien) und neurologischen Nebenwirkungen klinisch vertretbar⁴. Aktuelle klinische Studien, die relativ unspezifische

Kaliumkanalinhibitoren wie 4-Aminopyridin bei neurologischen Erkrankungen erforschen, zeigten erfreulicherweise ebenfalls eine sehr gute Verträglichkeit der Medikamente⁴. EAG (K_v10.1) ist ein onkogener Kaliumkanal, der in ca 70 % aller Tumoren nachgewiesen werden kann, der normalerweise aber nur in neuronalem Gewebe exprimiert wird^{7,103}. Der Kaliumkanalinhibitor Astemizol (ein Histaminrezeptorantagonist, der ursprünglich zur Behandlung von Allergien und urtikariellen Hauterkrankungen hergestellt wurde), kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und somit auch keine neuronalen Nebenwirkungen an K_v10.1 hervorrufen. Im Tiermodell (SCID-Maus) konnte durch die orale Verabreichung von Astemizol bei guter Verträglichkeit eine vergleichbare Wachstumsinhibition von K_v10.1-exprimierenden Tumoren der Zelllinien CHO und MDA-MB435S wie durch die Maximaldosis des Chemotherapeutikums Cyclofosfamid erreicht werden¹⁰⁴. Ein weiterer Ansatzpunkt bietet der Kaliumkanal K_v11.1 (hERG), welcher vor allem im Herzmuskelgewebe exprimiert wird. Die pharmakologische Inhibition dieses Kanals kann zu Herzrhythmusstörungen wie dem Long-QT-Syndrom führen. Im Unterschied zum Herzmuskelgewebe konnte man jedoch in vielen Tumoren, die diesen Kanal überexprimieren, eine Spleißvariante des Kanals feststellen (hERG1B), für die es inzwischen spezifische Inhibitoren gibt^{105,106}. In in vitro- und in vivo-Experimenten konnte mit einem hERG1B-Inhibitor Apoptose induziert werden, die Leukämie last von HL60-Zellen in SCID-Mäusen um 90 % reduziert und das Langzeitüberleben verlängert werden, ohne dass eine erhöhte Kardiotoxizität beobachtet wurde¹⁰⁷. Weitere Hinweise auf eine Beeinflussung des Tumorwachstums durch K_v-Kaliumkanäle konnte in Adeno-Bronchialkarzinomzellen A549 sowie in Melanomzellen B16F10 erbracht werden. Hier konnte in vivo unter Verwendung von Margatoxin eine 75 % bzw. 90 % Reduktion der Tumormasse erreicht werden^{108,109}. Ein großer Vorteil von einigen Kaliumkanalinhibitoren wie beispielsweise Astemizol, Terfenadin, Phenytoin oder Clofazimin ist, dass sie schon seit längerem für andere Erkrankungen im klinischen Gebrauch sind und somit bereits Erfahrungen im Hinblick auf Sicherheit und Toxizität vorliegen und deshalb direkt Phase II-Studien möglich wären.

Neben der alleinigen chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren mit Kaliumkanalmodulatoren wäre eine Kombination mit einer Radiotherapie ein interessanter Therapieansatz. Die vorliegende Arbeit hat die Erforschung der kombinierten Kaliumkanalblockade und Bestrahlung in Hinblick auf die Aktivierung der Kaliumkanäle sowie den Zellzyklus und den Kalziumhaushalt von HEK 293-Zellen zum Ziel. Eine Kombination mit einer Bestrahlung, die über oben geschilderte Signalwege zu einer Radiosensibilisierung des Tumorgewebes bei gleichzeitiger Schonung des Normalgewebes führt und darüber hinaus noch eine gute klinische Verträglichkeit mit geringen Nebenwirkungen aufweist, würde eine ideale Krebstherapie darstellen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass bei nicht entdifferenzierten Zellen eine Inhibierung der postradiogenen Kaliumkanalaktivierung zu einem verzögerten Wiedereintritt in den Zellzyklus kommt. Dies kann dazu führen, dass der Zelle mehr Zeit zu einer verbesserten Reparatur der induzierten DNA-Schäden zur Verfügung steht. Ob hierdurch funktionelle Auswirkungen wie geringeren Schäden am Normalgewebe im Vergleich zu den Tumorzellen und zu einer additiven oder gar supraadditiven Verminderung der Klonogenität bewirkt werden kann und sich dies auch auf die Klinik übertragen lassen kann, muss mit weiteren Experimenten erforscht werden.

5 Zusammenfassung

In vielen Tumorzellen ist eine aberrante Expression von Ionenkanälen im Allgemeinen und spannungsaktivierten Kaliumkanälen im Besonderen nachgewiesen. Diese nehmen großen Einfluss auf den Zellzyklus, die Differenzierung und die Proliferationsrate der Zellen. Bisher noch kaum erforscht ist die Wechselwirkung von Bestrahlung als eine der grundlegenden Säulen der Krebstherapie und spannungsaktivierten Kaliumkanälen. Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Effekte von Bestrahlung auf spannungsaktivierte K_v -Kanäle sowie die Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt und die Zellzyklusprogression der Zellen zu beschreiben.

Die einmalige Bestrahlung von HEK 293-Zellen induzierte innerhalb von 24 Stunden einen partiellen G_2/M -Arrest, welcher nach 48 Stunden wieder überwunden werden konnte. Diesem Zellzyklusarrest ging eine Aktivierung von spannungsabhängigen K_v -Kaliumkanälen voraus. Die Kaliumkanalaktivierung konnte eine Stunde nach der Bestrahlung nachgewiesen werden und erreichte nach ungefähr drei Stunden ein Maximum, um danach auf Werte wie vor der Bestrahlung abzufallen. Die Hemmung der Kaliumkanäle durch den unselektiven Kaliumkanalinhibitor TEA in submillimolaren Konzentrationen, die Use Dependent Inactivation sowie die Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik lassen auf eine Zugehörigkeit zu Shaker- und Shaw-Subtypen schließen. Durch eine Inhibition der K_v -Kanäle konnte das Wiedereintreten der Zellen in den Zellzyklus nach 48 Stunden verhindert werden. Nach Bestrahlung zeigte sich zudem ein erhöhter Kalziumeinstrom nach extrazellulärer Kalziumdepletion. Hier konnte durch eine K_v -Kanalinhibition eine deutliche Steigerung des Kalziumeinstroms nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Ein möglicher zu Grunde liegender Signalweg könnte eine radiogene Aktivierung des IGF-Rezeptors mit konsekutiver Aktivierung der PI_3 Kinase, der PDK-1 sowie der SGK-1 und nachfolgender Aktivierung der K_v -Kanäle mit hieraus resultierenden Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt und das Kalziumsignaling sowie auf den Zellzyklus darstellen. Die funktionelle Signifikanz der beobachteten Effekte im Sinne der Klonogenität und des postradiogenen Zelltodes muss anhand weiterer Experimente erforscht werden.

6 Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden unter dem folgenden Titel als Poster veröffentlicht:

Helene Reuter, Daniela Palme, Guido Henke, Stephan M. Huber

Ionizing radiation-induced G2/M cell cycle arrest is preceded by activation of voltage-gated potassium channels in the plasma membrane

15th AEK Cancer Congress 2009, Berlin

Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen 2009, Posterpreis

Joint Meeting GRK 880 & 1302 2009, Schloss Maurach

7 Literaturverzeichnis

1. Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C. & Barton, M. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* **104**, 1129–37 (2005).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
4. Pardo, L. A. & Stühmer, W. The roles of K(+) channels in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 39–48 (2014).
5. Wonderlin, W. F. & Strobl, J. S. Potassium Channels, Proliferation and G1 Progression. *J. Membr. Biol.* **107**, 91–107 (1996).
6. DeCoursey, T. E., Chandy, K. G., Gupta, S. & Cahalan, M. D. Voltage-gated K channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature* (1984).
7. Pardo, L. A. *et al.* Oncogenic potential of EAG K+ channels. *EMBO J.* **18**, 5540–5547 (1999).
8. Pardo, L. A. Voltage-Gated Potassium Channels in Cell Proliferation. *Physiology* 285–292 (2004).
9. Stegen, B. *et al.* Ca²⁺-Activated IK K+ Channel Blockade Radiosensitizes Glioblastoma Cells. *Mol. cancer Res.* **13**, 1283–95 (2015).
10. Palme, D. *et al.* Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* (2013).
11. Bertoli, C., Skotheim, J. M. & de Bruin, R. a M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 518–

- 28 (2013).
12. Pardee, A. B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603–8 (1989).
 13. Deckbar, D., Jeggo, P. A. & Löbrich, M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 271–83 (2011).
 14. Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–91 (1997).
 15. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672–7 (1996).
 16. Murray, A. W. Turning on mitosis. *Curr. Biol.* **3**, 291–293 (1993).
 17. Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047–58 (2007).
 18. Blackiston, D. J., McLaughlin, K. A. & Levin, M. Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell cycle* **8**, 3527–36 (2009).
 19. Rouzaire-Dubois, B., Malo, M., Milandri, J.-B. & Dubois, J.-M. Cell size-proliferation relationship in rat glioma cells. *Glia* **45**, 249–57 (2004).
 20. Baserga, R. Is cell size important? *Cell Cycle* **6**, 814–6 (2007).
 21. Rouzaire-Dubois, B., O'Regan, S. & Dubois, J.-M. Cell size-dependent and independent proliferation of rodent neuroblastoma x glioma cells. *J. Cell. Physiol.* **203**, 243–50 (2005).
 22. Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P. & Barber, D. L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 686–98 (2011).
 23. Spitz, D. R., Azzam, E. I., Li, J. J. & Gius, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.* **23**, 311–322 (2004).

24. Chen, D. J. & Nirodi, C. S. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 6555–60 (2007).
25. Branzei, D. & Foiani, M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 208–19 (2010).
26. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
27. Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. & Prives, C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* **2**, 2438–2451 (1996).
28. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nat. Rev.* **461**, 1071–8 (2009).
29. Contessa, J. N. *et al.* Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene* **21**, 4032–4041 (2002).
30. Cosaceanu, D. *et al.* Ionizing radiation activates IGF-1R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism. *Oncogene* **26**, 2423–34 (2007).
31. Schmidt-Ullrich, R. K. *et al.* Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* (1997). at <http://www.nature.com/onc/journal/v15/n10/pdf/1201275a.pdf>
32. Norbury, C. J. & Hickson, I. D. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 367–401 (2001).
33. Cimprich, K. a & Cortez, D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 616–27 (2008).

34. Dittmann, K., Mayer, C. & Rodemann, H. P. Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlentherapie und Onkol. Organ der Dtsch. Röntgengesellschaft* **186**, 1–6 (2010).
35. Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 915–28 (2008).
36. Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 606–19 (2006).
37. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–7 (2002).
38. LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. & Roberts, C. T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* **16**, 143–63 (1995).
39. Dupont, J., Pierre, A., Froment, P. & Moreau, C. The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm. Metab. Res.* **35**, 740–50 (2003).
40. Patti, M. E. *et al.* 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mic. *J. Biol. Chem.* **270**, 24670–3 (1995).
41. Pelicci, G. *et al.* A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**, 93–104 (1992).
42. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–74 (2007).
43. Cosaceanu, D. *et al.* Modulation of response to radiation of human lung cancer cells following insulin-like growth factor 1 receptor inactivation. *Cancer Lett.* **222**, 173–181 (2004).
44. Bandyopadhyay, D., Mahitosch, M., Adam, L., Mendelsohn, J. & Kumar,

- R. Physical Interaction between Epidermal Growth Factor Receptor and DNA-dependent Protein Kinase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 1568–1573 (1998).
45. Dittmann, K., Mayer, C. & Rodemann, H.-P. Inhibition of radiation-induced EGFR nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother. Oncol.* **76**, 157–61 (2005).
46. Yuan, T. L. & Cantley, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497–510 (2008).
47. Cantley, L. C. & Neel, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4240–5 (1999).
48. To, M. D., Perez-Losada, J., Mao, J.-H. & Balmain, A. Crosstalk Between Pten and Ras Signaling Pathways in Tumor Development. *Cell Cycle* **4**, 1185–1188 (2005).
49. Lang, F. & Cohen, P. Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci. Signal.* **2001**, re17 (2001).
50. Lang, F. & Shumilina, E. Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB J.* **27**, 3–12 (2013).
51. Wärrntges, S. *et al.* Cerebral localization and regulation of the cell volume-sensitive serum- and glucocorticoid-dependent kinase SGK1. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **443**, 617–24 (2002).
52. Gamper, N. *et al.* IGF-1 up-regulates K⁺ channels via PI3-kinase, PDK1 and SGK1. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **443**, 625–34 (2002).
53. Laufer, J. *et al.* Cellular Physiology and Biochemistry The C-Terminal PDZ-Binding Motif in the Kv1 . 5 Potassium Channel Governs its Modulation by the Na⁺ / H⁺ Exchanger Regulatory Factor 2. *Cell. Physiol. Biochem.* (2009).

54. Lang, F. *et al.* Regulation of channels by the serum and glucocorticoid-inducible kinase - Implications for transport, excitability and cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.* **13**, 41–50 (2003).
55. Shumilina, E. *et al.* Deranged Kv channel regulation in fibroblasts from mice lacking the serum and glucocorticoid inducible kinase SGK1. *J. Cell. Physiol.* **204**, 87–98 (2005).
56. McCoy, J. G. & Nimigean, C. M. Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 272–85 (2012).
57. MacKinnon, R. Minireview Potassium channels. *FEBS Lett.* **555**, 62–65 (2003).
58. Gutman, G. A. *et al.* International Union of Pharmacology . LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 473–508 (2005).
59. Henke, G., Maier, G., Wallisch, S., Boehmer, C. & Lang, F. Regulation of the Voltage Gated K⁺ Channel Kv1.3 by the Ubiquitin Ligase Nedd4-2 and the Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase SGK1. *J. Cell. Physiol.* **199**, 194–199 (2004).
60. Gubitosi-Klug, R. a, Mancuso, D. J. & Gross, R. W. The human Kv1.1 channel is palmitoylated, modulating voltage sensing: Identification of a palmitoylation consensus sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5964–5968 (2005).
61. Swartz, K. J. Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 905–16 (2004).
62. Bezanilla, F. & Stefani, E. *Gating Currents. Methods Enzymol.* **293**, (Elsevier, 1998).
63. Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* **349**, 305–310 (1991).

64. Zhou, M., Morais-Cabral, J. H., Mann, S. & MacKinnon, R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* **411**, 657–661 (2001).
65. Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **80**, 259–268 (1995).
66. Lang, F. *et al.* Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* **205**, 147–57 (2005).
67. Huber, S. M. Oncochannels. *Cell Calcium* **53**, 241–55 (2013).
68. Freedman, B., Price, M. & Deutsch, C. Evidence for voltage modulation of IL-2 production in mitogen-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* (1992).
69. S Amigorena, D Choquet, J L Teillaud, H. K. and W. H. F. Ion channel blockers inhibit B cell activation at a precise stage of the G1 phase of the cell cycle. Possible involvement of K⁺ channels. *J. Immunol.* (1990). at <<http://www.jimmunol.org/content/144/6/2038.full.pdf>>
70. Chiu, S. Y. & Wilson, G. F. The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. *J. Physiol.* **408**, 199–222 (1989).
71. Woodfork, K. A., Wonderlin, W. F., Peterson, V. A. & Strobl, J. S. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J. Cell. Physiol.* **162**, 163–71 (1995).
72. Kaczmarek, L. K. Non-conducting functions of voltage-gated ion channels. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 761–71 (2006).
73. Hegle, A. P., Marble, D. D. & Wilson, G. F. A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-à-go-go K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2886–91 (2006).
74. Norris, A. J., Foeger, N. C. & Nerbonne, J. M. Neuronal Voltage-Gated K⁺ (Kv) Channels Function in Macromolecular Complexes. *Neurosci. Lett.*

- 486**, 73–77 (2011).
75. Bregestovski, P., Medina, I. & Goyda, E. Regulation of potassium conductance in the cellular membrane at early embryogenesis. *J. Physiol.* **86**, 109–115 (1992).
 76. Kong, S. K., Suen, Y. K., Choy, Y. M., Fung, K. P. & Lee, C. Y. Membrane depolarization was required to induce DNA synthesis in murine macrophage cell line PU5-1.8. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **13**, 329–39 (1991).
 77. Sundelacruz, S., Levin, M. & Kaplan, D. L. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev. Reports* **5**, 231–246 (2009).
 78. Prevarskaya, N., Skryma, R. & Shuba, Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol. Med.* **16**, 107–121 (2010).
 79. Arcangeli, A. *et al.* A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J. Physiol.* **489** (Pt 2, 455–71 (1995).
 80. Binggeli, R. & Weinstein, R. C. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J. Theor. Biol.* **123**, 377–401 (1986).
 81. Tanneur, V. *et al.* Time-dependent regulation of capacitative Ca²⁺ entry by IGF-1 in human embryonic kidney cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **445**, 74–9 (2002).
 82. Huber, S. M., Misovic, M., Mayer, C., Rodemann, H.-P. & Dittmann, K. EGFR-mediated stimulation of sodium / glucose cotransport promotes survival of irradiated human A549 lung adenocarcinoma cells. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* (2012).
 83. Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R. & Prevarskaya, N. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**,

- 2532–2546 (2014).
84. Rouzaire-Dubois, B. & Dubois, J. M. Calcium-Dependent Proliferation of NG108-15. *Gen. Physiol. Biophys.* 231–239 (2004).
 85. Boynton, A. L., Whitfield, J. F., Isaacs, R. J. & Tremblay, R. The control of human WI-38 cell proliferation by extracellular calcium and its elimination by SV-40 virus-induced proliferative transformation. *J. Cell. Physiol.* **92**, 241–7 (1977).
 86. Capiod, T. The need for calcium channels in cell proliferation. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **8**, 4–17 (2013).
 87. Tani, D., Monteilh-Zoller, M. K., Fleig, A. & Penner, R. Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNuM (TRPM7) currents. *Cell Calcium* **41**, 249–60 (2007).
 88. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21 (2000).
 89. Lipskaia, L., Hulot, J.-S. & Lompré, A.-M. Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **457**, 673–85 (2009).
 90. Arredouani, A., Yu, F., Sun, L. & Machaca, K. Regulation of store-operated Ca²⁺ entry during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **123**, 2155–62 (2010).
 91. Parekh, A. B. & Penner, R. Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* **77**, 901–30 (1997).
 92. Whitaker, M. Calcium microdomains and cell cycle control. *Cell Calcium* **40**, 585–592 (2006).
 93. De Riso, L., Santella, L., Kyojuka, K. & Carafoli, E. Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium* **23**, (1998).
 94. Skelding, K. a., Rostas, J. a. P. & Verrills, N. M. Controlling the cell cycle:

- The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle* **10**, 631–639 (2011).
95. Numberger, M. & Draguhn, A. Patch-Clamp-Technik. (1996).
96. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450 (1985).
97. Boehmer, C. *et al.* Modulation of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1 . 5 by the SGK1 Protein Kinase Involves Inhibition of Channel Ubiquitination. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**, 591–600 (2008).
98. Klumpp, D. *et al.* Targeting TRPM2 Channels Impairs Radiation-Induced Cell Cycle Arrest and Fosters Cell Death of T Cell Leukemia Cells in a Bcl-2-Dependent Manner. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 8026702 (2016).
99. Gibhardt, C. S. *et al.* X-ray irradiation activates K^{+} channels via H_2O_2 signaling. *Sci. Rep.* **5**, 13861 (2015).
100. Roth, B. *et al.* Low-dose photon irradiation alters cell differentiation via activation of hK channels. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **467**, 1835–1849 (2014).
101. Steinle, M. *et al.* Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K^{+} channels. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **101**, 122–6 (2011).
102. Roderick, H. L. & Cook, S. J. Ca^{2+} signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca^{2+} for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 361–75 (2008).
103. Urrego, D. *et al.* Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2014** 1–9 (2014).
104. Downie, B. R. *et al.* Eag1 expression interferes with hypoxia homeostasis and induces angiogenesis in tumors. *J. Biol. Chem.* **283**, 36234–36240

(2008).

105. Wei, X. *et al.* ZC88, a novel 4-Amino piperidine analog, inhibits the growth of neuroblastoma cells through blocking hERG potassium channel. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 450–457 (2013).
106. Pillozzi, S. *et al.* Differential expression of hERG1A and hERG1B genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia identifies different prognostic subgroups. *Leukemia* **28**, 1352–5 (2014).
107. Leanza, L., Managò, A., Zoratti, M., Gulbins, E. & Szabo, I. Pharmacological targeting of ion channels for cancer therapy: In vivo evidences. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* (2015). doi:10.1016/j.bbamcr.2015.11.032
108. Leanza, L. *et al.* Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol. Med.* **4**, 577–593 (2012).
109. Jang, S. H., Choi, S. Y., Ryu, P. D. & Lee, S. Y. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **651**, 26–32 (2011).

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Radioonkologie im Labor für Experimentelle Radioonkologie, Hoppe-Seyler-Straße 3, Tübingen unter der Betreuung durch Prof. Dr. Stephan M. Huber durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Huber.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch H. Faltin, I. Müller und Prof. Dr. Huber von mir eigenständig durchgeführt.

Die Western Blots sowie FACS-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit I. Müller durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. Huber durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Beratung durch Prof. Dr. Huber verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 21.09.2016

9 Danksagung

Herzlichen Dank an

Stephan Huber - für die Anleitung und die Idee zu dieser Arbeit sowie die oft etwas unkonventionellen und pragmatischen Lösungsansätze bei Problemen

Heidi Faltin - für die geduldige Einarbeitung und Einweisung in die Arbeiten im Labor und die Hilfe bei Fragen aller Art

Ilka Müller - für die Unterstützung bei einigen Versuchen

Justine Rudner - für fachlichen Ratschlag und ein jederzeit offenes Ohr bei Problemen und Fragen sowie hilfreichen Anregungen

Das IZKF-Promotionskolleg - für die spannenden Einblicke in die Arbeit anderer Arbeitsgruppen, die Gelegenheit für Vorträge sowie die großzügige finanzielle Unterstützung

Meine Freunde - was ist der Mensch ohne seine Freunde, die einen zur rechten Zeit ablenken und einen das Glück spüren lassen?

Meine Eltern - immer seid ihr da, wenn ich euch brauche, wirklich immer. Ihr seid - mit all euren kleinen Ecken und Kanten - die großartigsten, großzügigsten und warmherzigsten Eltern, die man sich nur vorstellen und wünschen kann.

Norbert -

Man braucht nur eine Insel, allein im weiten Meer.

Man braucht nur einen Menschen, den aber braucht man sehr.

Mascha Kaleko

Danke für alles.